Leiden
1958

COLORIMETRISCHE BEPALING VAN ALDOSTERON IN URINE

A. J. MOOLENAAR

STANFORD-LANE MEDICAL LIBRARY

COLORIMETRISCHE BEPALING VAN ALDOSTERON IN URINE

PROEFSCHRIFT
TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR IN DE WIS- EN NATUURKUNDE AAN DE RIJKSUNIVERSITEIT TE LEIDEN OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS DR. S. E. DE JONGH, HOOGLERAAR IN DE FACULTEIT DER GENEESKUNDE, PUBLIEK TE VERDEDIGEN OP
WOENSDAG 19 MAART 1958 TE 14 UUR

DOOR

ABRAHAM JOHANNES MOOLENAAR
GEBOREN TE LISSE IN 1928

UITGEVERIJ EXCELSIOR - ORANJEPLEIN 96 - 'S-GRAVENHAGE

Promotor: Prof. Dr. A. Querido

Aan mijn Ouders
Aan mijn Vrouw

Digitized by the Internet Archive
in 2025

https://archive.org/details/colorimetrischeb0000vari

INHOUD

Voorwoord 7

Hoofdstuk I Inleiding 8

Hoofdstuk II Reacties welke gebruikt zijn bij de identificatie en chemische bepaling van aldosteron 13

Hoofdstuk III De belangrijkste, niet-biologische bepalingsmethodes van aldosteron 16

Hoofdstuk IV Overzicht van eigen methodiek 20

Hoofdstuk V Bereiding van het urine-extract 26

Hoofdstuk VI Afscheiding van de aldosteronfractie 28

Hoofdstuk VII Colorimetrische bepaling 33

Hoofdstuk VIII Toepassing van de kleurreactie op het urine-extract. Berekening van het aldosterongehalte 43

Hoofdstuk IX Resultaten 49

Samenvatting 52

Summary 53

Literatuur 55

Op verzoek van de Faculteit der Wis- en Natuurkunde volgen hieronder enige persoonlijke gegevens.

Na in 1947 eindexamen aan de Chr. H.B.S. te Leiden te hebben afgelegd, begon ik in September van dat jaar mijn studie aan de Rijksuniversiteit te Leiden.

In Februari 1951 werd het candidaatsexamen in de faculteit der Wis- en Natuurkunde - letter l - afgelegd.

Onder leiding van de hoogleraren Dr. E. H. Vogelenzang, Dr. A. J. Steenhauer en Dr. R. Hegnauer werd de studie voor het doctoraalexamen, met als hoofdvak pharmacie, voortgezet.

Voor het bijvak klinische chemie werd gedurende een half jaar in het laboratorium van de Tweede afdeling voor inwendige Geneeskunde te Leiden (Hoofd Prof. Dr. A. Querido) gewerkt. Na het doctoraalexamen, dat in April 1954 werd afgelegd, vervulde ik aan dit laboratorium een assistentschap.

Hier werd onder leiding van Prof. Dr. A. Querido en in samenwerking met Dr. A. A. H. Kassenaar en Dr. J. de Graeff het in dit proefschrift ten dele beschreven onderzoek verricht. Bij het begin van dit onderzoek was een niet-biologische bepalingsmethode van aldosteron in urine nog niet bekend. Tijdens het uitwerken van een chemische bepalingsmethode heeft de schaarste aan zuiver aldosteron een groot struikelblok gevormd.

Veel dank ben ik dan ook verschuldigd aan de N. V. Organon, die mij in 1955 200 µg aldosteron deed toekomen, eveneens aan Dr. H. L. Mason, van wie ik 150 µg aldosteron ontving.

Door bemiddeling van Dr. A. Wettstein kreeg ik de beschikking over een aantal steroiden, waarvoor ik mijn erkentelijkheid uitspreek. Door deze gift werd ik in de gelegenheid gesteld het onderzoek, dat beschreven is in hoofdstuk VII van dit proefschrift, te verrichten.

Met Mr. en Mrs. Tait mocht ik verschillende vruchtdragende gesprekken voeren. Zij waren tevens zo vriendelijk om enige door mij verrichte bepalingen van aldosteron in urine met hun methode te controleren.

Op deze plaats moge ik bovendien Mej. C. Allan danken voor de uitvoering van een groot aantal analyses.

Een korte beschrijving van de gevolgde methodes werd reeds in verschillende tijdschriften gepubliceerd (Moolenaar, A. J., 1956, 1957[I] en 1957[II]). De methode werd eveneens gerapporteerd op het „Symposium on Aldosterone", dat in Juni 1957 te Genève werd gehouden.

Hoofdstuk I

INLEIDING

Historisch overzicht

Nadat Addison omstreeks 1850 had vastgesteld dat bijnierinsufficientie de oorzaak was van een ziektebeeld met kenmerkende symptomen, duurde het tot 1926 voordat een verband tussen de regulering van het electrolytenevenwicht en de bijnierschors werd gevonden. Ondanks de moeilijkheden, verbonden aan de chemische bepaling van Na en K in het bloed, vonden Baumann en Kurland (1926) bij katten en konijnen na adrenalectomie veranderingen in het electrolytengehalte van het bloedserum. Na verwijdering van de bijnieren daalde het Na-gehalte van het serum, terwijl het K-gehalte toenam. Een zelfde verandering in bloedsamenstelling vond Loeb (1932) bij patienten, lijdend aan de ziekte van Addison.

In 1928 slaagde men er in extracten uit bijnieren te bereiden, waarmee bijnierloze dieren in leven konden worden gehouden. Men nam waar dat na inspuiting van een dergelijk extract het verstoorde electrolytenevenwicht van bijnierloze dieren zich herstelde.

Aanvankelijk werd de werking van deze extracten op de electrolytenbalans als de voornaamste beschouwd (Loeb e.a. 1933, Harrop e.a. 1935). De eveneens belangrijke werking op het koolhydraatmetabolisme werd eerst later o.a. door Swingle e.a. (1938) beschreven.

Om een inzicht te verkrijgen in de aard van de door de bijnierschors geproduceerde stoffen werden door een aantal onderzoekers w.o. Reichstein en Kendall runder- en varkensbijnieren geanalyseerd. Dit leidde in de jaren tussen 1935 en 1940 tot de isolering in kristalline vorm van 28 steroiden. Van deze steroiden kwamen er slechts 6 met hun biologische werking min of meer overeen met die van het totale bijnierextract (Tabel I).

Van deze groep bleken de steroiden met een zuurstofatoom aan C_{11} vooral actief te zijn op het koolhydraatmetabolisme. Deze „11-oxysteroiden" werden derhalve glucocorticosteroiden genoemd. De 11-desoxysteroiden waren voornamelijk actief op de Na- en K-balans.

De werking op het koolhydraatmetabolisme van het bijnierextract kon geheel aan het gehalte aan glucocorticosteroiden worden toegeschreven. De kleine hoeveelheid 11-des-

oxysteroiden kon echter de sterke activiteit van het bijnierextract op de Na- en K-huishouding niet verklaren. Deze activiteit bleek nog voornamelijk in de amorphe rest van het bijnierextract aanwezig te zijn.

Tabel I
Steroiden, waarvan de biologische activiteit enigszins gelijkt op die van bijnierextract.

	Synoniemen	Auteur
Δ^4 Pregneen-triol 11β, 17α, 21 - dion 3, 20	17-hydroxycorticosteron Cortisol Compound F	Kendall
Δ^4 Pregneen-diol 17α, 21 - trion 3,11,20	17-hydroxy-11-dehydrocorticosteron Cortison Compound E	Kendall
Δ^4 Pregneen-diol 11β, 21 - dion 3,20	Corticosteron Compound B	Kendall
Δ^4 Pregneen-ol 21 - trion 3,11,20	11-dehydrocorticosteron Compound A	Kendall
Δ^4 Pregneen-diol 17α, 21 - dion 3,20	17-hydroxy-11-desoxycorticosteron Compound S	Reichstein
Δ^4 Pregneen-ol 21 - dion 3,20	11-desoxycorticosteron DOC	Reichstein

Door proeven met deze amorphe fractie werd aangetoond, dat de biologische eigenschappen sterk geleken op die van 11-desoxycorticosteron. Deze nog onzuivere fractie was per gewichtseenheid echter 5-10 maal sterker werkzaam (Mason, 1939).

De ontwikkeling van nieuwe technieken voor papierchromatografie (Zaffaroni e.a. 1950, 1951, 1953, Bush 1952) en de uitwerking van gevoelige biologische ijkmethoden (Deming en Luetscher 1950, Simpson en Tait 1952, Singer en Venning 1952, Johnson 1954) verschaften na 1950 nieuwe mogelijkheden bij de bestudering van de door de bijnierschors geproduceerde stof met sterke werking op de electrolytenhuishouding.

Simpson en Tait (1952), Tait e.a. (1952) en Grundy e.a.

(1952) slaagden er in met behulp van papierchromatografie uit bijnierextracten een fractie af te zonderen welke in hun biologische test een sterke activiteit op de Na- en K-balans toonde. De actieve fractie welke zich in verschillende papierchromatografiesystemen als één component gedroeg, werd voorlopig electrocortine genoemd.

In samenwerking met Wettstein, Neher, von Euw en Reichstein werd door Tait en Simpson (1953) 22 mg kristallijn electrocortine uit 500 kg runderbijnieren afgezonderd. Deze isolering gelukte zeer kort hierna eveneens aan Mattox, Mason en Albert (1953).

De Engels-Zwitserse groep slaagde er ook in de structuur van het electrocortine op te helderen (Simpson e.a. 1954). De stof bleek te zijn Δ^4 Pregneen-diol-11β, 21 - dion-3,20-al-18 (fig. 2). Als definitieve naam werd nu aldosteron gekozen. In 1955 kon de structuur van het aldosteron door een totaalsynthese worden bevestigd (Schmidlin e. a. 1955).

Een steroide structuur als die van aldosteron, waarbij één van de hoekstandige CH_3 groepen is vervangen door een aldehydegroep, is in de natuur nog weinig gevonden. Een voorbeeld van een steroide met een aldehydegroep aan C_{19} is het strophantidine.

Terwijl Simpson e.a. hun aandacht richtten op de biologische activiteit van bijnierextracten, werd door Luetscher e.a. (Deming en Luetscher 1950, Luetscher e.a. 1952, Luetscher en Johnson 1953) waargenomen, dat in de urine van bepaalde patienten een fractie voorkwam welke, ingespoten bij geadrenalectomeerde ratten, een sterke Na-retentie veroorzaakte. Door verder onderzoek van deze fractie kon worden vastgesteld, dat het actieve materiaal geleek op de stof welke door Simpson in bijnierextracten was aangetoond (Luetscher en Johnson 1953 en 1954, Luetscher 1954). Een zelfde biologische activiteit van urine-extracten werd o.a. eveneens door Singer en Venning (1953) beschreven.

In samenwerking met Neher en Wettstein slaagde Luetscher (1954, 1955 en 1956) er in de actieve stof uit de urine van een drietal patienten in kristallijne vorm te isoleren en de identiteit hiervan met aldosteron vast te stellen.

Aan Simpson e.a. (Simpson e.a. 1952, Simpson en Tait 1954) gelukte het aldosteron zowel in bloed uit de bijniervene, alsook in de overige circulatie aan te tonen. Uit deze experimenten kon worden geconcludeerd, dat aldosteron inderdaad een hormoon was en niet een intermediair product dat in de bijnier tijdens de biosynthese wordt gevormd.

Over de chemie van de biosynthese van aldosteron in de bijnierschors is nog weinig bekend. Door Wettstein e.a. (1954) werd gevonden dat de opbrengst van aldosteron uit bijnierhomogenaten kon worden verhoogd door incubatie met 11-desoxycorticosteron. Door Kahnt e.a. (1955) werd waarschijnlijk

gemaakt dat de biosynthese van het aldosteron inderdaad gedeeltelijk via het 11-desoxycorticosteron kan verlopen. Na incubatie van een bijnierhomogenaat met C_{21}^{14} gemerkt 11-desoxycorticosteron bleek dat C_{21}^{14} aldosteron was gevormd.

Door Tait (1957) werd aangetoond dat de synthese van aldosteron plaats vindt in de zona glomerulosa van de bijnierschors. Na incubatie van dit deel van de bijnier met radioactief progesteron kon radioactief aldosteron worden verkregen.

Schema biosynthese

Aldosteron werd door Pincus (1955) voorlopig op de volgende manier geplaatst in het schema van de steroid-biosynthese (fig. 1):

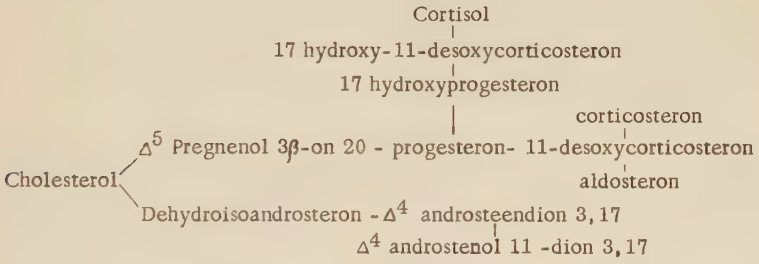


Fig. 1 Schema biosynthese van aldosteron

Dit schema kon worden opgesteld op grond van de resultaten welke werden verkregen door middel van incubatie of doorstroming van bijnierweefsel met oplossingen van verschillende steroiden. Een samenvatting van de literatuur over de omzettingen welke door de enzymsystemen in de bijnierschors konden worden verkregen, werd o. a. door Dorfmann (1953), Hechter en Pincus (1954) en Pincus (1955) gepubliceerd.

Door deze metabolische proeven en de gegevens verkregen door analyse van veneus bijnierbloed kon van vier steroiden worden vastgesteld dat deze door de bijnier als hormoon in het bloed worden afgescheiden, nl. cortisol, corticosteron, aldosteron en Δ^4 androstenol 11-dion 3,17 (Simpson e. a. 1952, Sweat 1955, Romanoff e. a. 1953, Pincus 1955).

Belang van een bepaling van aldosteron in urine

Bij een aantal ziekten welke gepaard gaan met oedeem-

vorming zoals het nephrotisch syndroom en hartgebreken, werd een verhoogde uitscheiding van aldosteron in de urine gevonden. Bij de bestudering van de pathophysiologie van deze ziekten kan de bepaling van aldosteron in de urine van nut zijn.

Ook bij de diagnose en de bestudering van het door Conn (1955) beschreven primaire hyperaldosteronisme is de aldosteronbepaling van belang. Bij deze ziekte wordt door een tumor of hyperplasie van de bijnierschors een grote hoeveelheid aldosteron geproduceerd.

Verschillende onderzoekers hebben reeds een aantal gegevens verschaft over de belangrijke functie welke het aldosteron heeft bij de regulering van de electrolyt en waterhuishouding van het lichaam. Voor een verdere bestudering hiervan en voor het onderzoek naar het mechanisme dat de aldosteronproductie reguleert kan een aldosteronbepaling in de urine eveneens goede diensten bewijzen.

Aard eigen onderzoek

Toen kort na de isolering van het aldosteron werd aangevangen met het uitwerken van een bepalingsmethode van dit steroide in de urine, werd aanvankelijk geëxperimenteerd met een biologische ijking. De resultaten welke met deze ijking werden bereikt waren echter weinig hoopgevend, zodat, na het bekend worden van de structuur van het aldosteron, werd gezocht naar een colorimetrische bepalingsmethode. De resultaten van dit onderzoek, waarvoor slechts ± 0,3 mg aldosteron ter beschikking stond, zullen in dit proefschrift worden besproken.

Hoofdstuk II

REACTIES WELKE GEBRUIKT ZIJN BIJ DE IDENTIFICATIE EN CHEMISCHE BEPALING VAN ALDOSTERON

Daar een specifieke kleurreactie op aldosteron niet bekend was, gebruikten verschillende onderzoekers voor de chemische bepaling van aldosteron meer algemene reacties. Deze reacties kunnen alleen worden toegepast wanneer de aldosteronfractie uit de urine eerst gezuiverd is van stoffen welke de gekozen reactie met aldosteron gemeen hebben of beinvloeden.

Bij de opheldering van de structuur van het aldosteron (Simpson e.a. 1954, Ham e.a. 1955) bleek, dat dit steroide in oplossing voornamelijk als half acetaal aanwezig was (fig. 2).

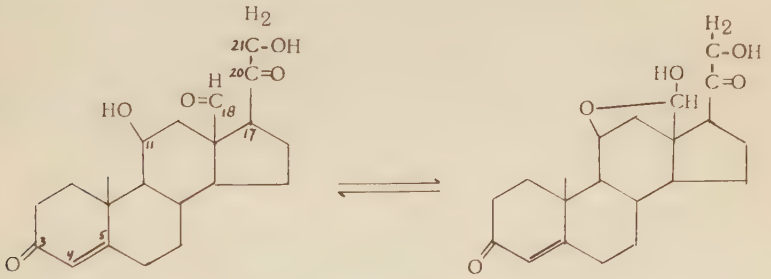


Fig. 2. Aldosteron

Op de volgende groepen in het aldosteronmolecule werden reeds verschillende reacties toegepast:

a. *De hydroxylgroepen*
De hydroxylgroep aan C_{21} en aan C_{18} (half acetaal structuur) kan met azijnzuuranhydride in pyridine worden geacetyleerd. Op deze wijze werden de acetaten, vermeld in tabel II bereid.

b. *De Δ^4 3 ketogroep*
Op een met loog bespoten en daarna gedroogd papierchromatogram geven Δ^4 3 ketosteroiden in U.V. licht een sterke gele fluorescentie. Deze reactie, gecombineerd met de tetrazoliumreactie (zie c.), wordt door Neher en Wettstein (1955, 1956) gebruikt voor een semiquantitatieve bepaling van aldosteron. Hiertoe wordt de gekleurde, resp. fluo-

rescerende vlek op het papierchromatogram vergeleken met verschillende hoeveelheden van een standaard. De nauwkeurigheid welke men met beide visuele schattingsmethoden kan bereiken is bij 1-5 µg ± 40%, bij 5-10 µg ± 20%.

Tabel II
Smeltpunten van aldosteron-acetaten

	Smeltpunt in °C	Auteur
C_{21} monoacetaat	198-199	Simpson e.a. (1954)
	193-196,5	Ham e.a. (1955)
	193-195	Mattox (1956)
C_{18} monoacetaat	217-219	Mattox en Mason (1953)
C_{18}-C_{21} diacetaat	70	Simpson e.a. (1954)
	80	Mattox e.a. (1956)

Het U.V. absorptiespectrum van steroiden met een Δ^4 3 ketogroep heeft een maximum bij 240 mµ. De meting van de U.V. absorptie van de geëlueerde aldosteronfractie van een gechromatografeerd urine-extract is echter niet nauwkeuriger dan de genoemde visuele schattingsmethodes (Simpson e.a. 1954).

c. *De α-ketol configuratie aan C_{17}*
Door de reducerende werking van deze α-ketolgroep kunnen tetrazoliumzouten (fig. 3 I) in sterk gekleurde formazanen (fig. 3 II) worden omgezet (Chen en Tewell 1951, 1953, Nowaczynski e.a. 1955, Mader en Buck 1952, (fig. 3).

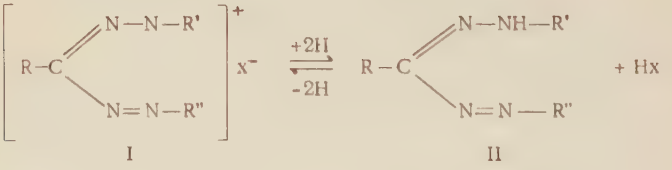


Fig. 3 Reactieschema van de reductie van tetrazoliumzouten

Neher en Wettstein (1955) gebruikten voor de bepaling van aldosteron het 3.3' dianisol bis 4.4' - 3.4 diphenyl tetrazoliumchloride („Blauw tetrazolium").
Op een papierchromatogram is met de tetrazoliumreactie 0.2 µg aldosteron/cm^2 nog juist zichtbaar te maken. Daar deze reactie ook gegeven wordt door ongezuiverd Whatman

papier, is het noodzakelijk dit papier vooraf door extractie te zuiveren.

d. *Substituenten aan C_{11}, C_{17} en C_{18}*
Door Clark (1955) werd gevonden, dat diverse corticosteroiden met diphenylamine in zuur milieu verschillend gekleurde verbindingen geven. Zo kleurt aldosteron blauw, cortison violet en cortisol groen. Deze kleurverschillen zouden worden veroorzaakt door een verschil in de substituenten aan C_{11}, C_{17} en C_{18}. Deze reactie is echter voor de bepaling van aldosteron in urine te ongevoelig: met 50 µg aldosteron per ml reagens wordt slechts een maximale extinctie verkregen van 0.15 (1 cm, 640 mµ).

e. *De carbonylgroepen*
Als reagentia welke met een carbonylgroep een gekleurde verbinding kunnen geven, zijn in de steroidchemie 2.4 dinitrophenylhydrazine en phenylhydrazine in gebruikt. Phenylhydrazine vormt echter alleen een gekleurd product met een carbonylgroep welke deel uitmaakt van een dihydroxyacetonconfiguratie (Porter en Silber 1950). Aldosteron bleek dan ook met dit reagens geen zichtbare reactie te geven (Simpson e.a. 1954).
De reactie met 2.4 dinitrophenylhydrazine heeft naar onze mening van de beschreven reacties de meeste voordelen. Door Gornall e.a. (1952) is er op gewezen, dat de absorptiecurves van de reactieproducten van diverse steroiden met dit reagens, gemeten in alkoholische loog, onderling sterk verschillen.
Daar de reactie bovendien zeer gevoelig bleek te zijn, besloten wij na te gaan in hoeverre deze bruikbaar was voor de bepaling van aldosteron in urine.

Hoofdstuk III

DE BELANGRIJKSTE, NIET BIOLOGISCHE BEPALINGSMETHODES VAN ALDOSTERON

Principe van de bepaling van aldosteron in de urine

Voordat men één van de in het vorige hoofdstuk genoemde reacties kan toepassen moet de aldosteronfractie uit de urine worden geisoleerd. Hiervoor is het noodzakelijk het aldosteron door extractie in een klein volume te concentreren. De extractie van een steroide uit de urine wordt echter vaak gecompliceerd doordat het steroide in geconjugeerde toestand wordt uitgescheiden. Door conjugatie met een hydrophiele component, zoals glucuronzuur, wordt de oplosbaarheid in water zo groot dat extractie uit de urine en de scheiding van andere geconjugeerde verbindingen moeilijk uitvoerbaar is. Extractie van aldosteron uit urine met behulp van vetoplosmiddelen is dan ook eerst mogelijk nadat het aldosteronconjugaat is gehydrolyseerd. Vervolgens moet het aldosteron in het urine-extract worden gescheiden van andere stoffen welke de gekozen reactie gemeen hebben met aldosteron. Voor deze scheiding wordt gewoonlijk van papierchromatografie gebruik gemaakt. Om een goede papierchromatografische scheiding te verkrijgen is het van belang vooraf zoveel mogelijk ballaststoffen te verwijderen.

Op de gezuiverde aldosteronfractie kan nu een reactie worden toegepast waarmee de hoeveelheid aldosteron quantitatief kan worden bepaald.

In principe bestaat de chemische aldosteronbepaling dus uit de volgende bewerkingen:

a. Hydrolyse en extractie van de urine
b. Zuivering van het urine-extract
c. Toepassing van een chemische reactie.

Tot nu toe werd door twee groepen van onderzoekers een chemische aldosteronbepaling ontwikkeld. De door Neher en Wettstein beschreven methode wordt reeds in verschillende laboratoria toegepast. De methode van Ayres, Simpson en Tait wordt, zover ons bekend is, alleen door hen zelf gebruikt.

Alvorens tot de beschrijving van de door ons ontwikkelde bepalingsmethode over te gaan, zullen de methodes van Neher e.a. en Ayres e.a. worden besproken.

A. "PHYSICOCHEMISCHE" BEPALINGSMETHODE VAN ALDOSTERON IN URINE
van R. Neher en A. Wettstein (1956)

Hydrolyse en extractie

De urine wordt gedurende 24 uur bij pH 1.5 en een temperatuur van 15 tot 20° gehydrolyseerd en hierna met chloroform uitgeschud. Na zuivering van het chloroform extract met 0.1 N NaOH en water wordt onder vacuum ingedampt. Indien het residu meer dan 60 mg weegt, wordt het door chromatografie over een silicagelkolom verder gezuiverd (Neher en Wettstein 1955).

Papierchromatografie

Als eerste papierchromatografiesysteem wordt het chloroform-formamidesysteem van Zaffaroni gebruikt. Naast het urine-extract worden op het papierchromatogram als indicator 10 µg cortison en 10 µg cortisol aangebracht. In dit systeem verplaatst aldosteron zich even snel als cortison. De cortisonfractie, welke eveneens het aldosteron bevat, wordt uitgeknipt, geëlueerd, en vervolgens gechromatografeerd in het Bush C systeem. Naast de aldosteronfractie worden $\frac{1}{2}$, 1, 2, 3 en 5 µg cortisol op het papier gebracht. In dit systeem loopt aldosteron even snel als cortisol.

Semiquantitatieve bepaling

Het chromatogram wordt nu bevochtigd met een oplossing van een tetrazoliumzout in loog. De gekleurde vlek welke op de cortisolplaats ontstaat wordt nu visueel vergeleken met die van de cortisolstandaardvlekken. Hierna wordt het papierchromatogram bij 90° gedroogd. De hoeveelheid aldosteron wordt nu nog eens geschat door vergelijking van de fluorescentie onder U.V. licht van de aldosteronvlek met de standaardvlekken. Het verschil tussen deze bepaling en die met tetrazolium mag niet meer dan 50% bedragen voor de lage aldosteronconcentraties en niet meer dan 30% voor de hoge aldosteronconcentraties.

Bij de berekening wordt het gemiddelde van beide bepalingsmethodes gebruikt. Bij een groot verschil tussen beide bepalingen moet de laagste uitkomst het betrouwbaarst worden geacht.

Resultaten

Bij gezonde personen werd een aldosteronuitscheiding gevonden van 1-9 µg per 24 uur.

Recovery: resp. 5, 10 en 20 µg aldosteron werden aan porties van 500 ml urine toegevoegd. Hiervan werd resp. 68, 76 en 86% teruggevonden.

Reproduceerbaarheid: Indien bepalingen door dezelfde per-

soon werd uitgevoerd was de onderlinge afwijking minder dan ± 20%. Wanneer de bepalingen door verschillende personen werden verricht of bij aanwezigheid van relatief weinig aldosteron, bedroeg de afwijking ± 25 tot ± 30%.

Bezwaren

Tegen deze bepalingsmethode menen wij de volgende bezwaren te moeten aanvoeren:

1. De visuele schattingsmethode is subjectief.
2. Het gebruik van reacties welke alleen specifiek zijn voor bepaalde groepen van het steroidmolecule is hier riskant. Indien de aldosteronfractie met een ander Δ^4 3-keto 17α ketolsteroide is verontreinigd zal men uit de waargenomen kleur of fluorescentie een te hoog aldosterongehalte berekenen.
3. Bij aanwezigheid van een grote hoeveelheid cortisol is het mogelijk dat na de eerste maal papierchromatograferen de aldosteronfractie nog met dit steroide is verontreinigd. Op het tweede chromatogram zal men hiervan niets merken doordat aldosteron en cortisol hierop even snel lopen. Dit kan tot gevolg hebben dat een cortisolverontreiniging als aldosteron wordt bepaald.

B. "PHYSICOCHEMISCHE" BEPALINGSMETHODE VAN ALDOSTERON IN URINE

van A. P. J. Ayres, S. A. Simpson en J. F. Tait (1956)

Bereiding van het urine-extract

Nadat de urine op pH 1 is gebracht wordt C^{14} gemerkt cortisol toegevoegd. De urine wordt dan gedurende 24 uur continu bij kamertemperatuur met chloroform geëxtraheerd. Het chloroformextract wordt gezuiverd door uitschudden met N/20 Na_2CO_3 en water, waarna het bij 40° onder vacuum wordt ingedampt. Het residu wordt verder gezuiverd door chromatografie over een silicagelkolom.

Afscheiding van de aldosteronfractie

Het eluaat van de silicagelkolom wordt nu gechromatografeerd over een kiezelgoer kolom met een systeem waarin aldosteron en cortisol dezelfde verdelings-coëfficiënt hebben. De fracties met radioactief materiaal worden nu geacetyleerd, waarna als merkstof 0.5 µg aldosterondiacetaat wordt toegevoegd waarvan de carboxylgroep C^{14} bevat. Het geacetyleerde mengsel wordt nu over een Celite 545 kolom gechromatografeerd. Bij de ontwikkeling van deze kolom kunnen de acetaten van aldosteron en cortisol gescheiden worden opgevangen. De radioactieve fracties worden nu verder door papierchromatografie gezuiverd.

Fluorimetrische bepaling van het aldosteron

Het papierchromatogram wordt met loog bespoten en gedroogd. De fluorescentie van de aldosteronvlek in U.V. licht wordt nu met een fluorimeter, welke met een interferentiefilter is uitgerust, gemeten.

Resultaten

Bij gezonde personen werd een aldosteronuitscheiding gevonden van 4.6-18.9 µg per 24 uur.

2-3 µg aldosteron kan worden bepaald met een spreiding van 10-15%, terwijl 0.5 µg aldosteron nog kan worden aangetoond.

Recovery: Bij 10 experimenten waarbij 15 µg aldosteron aan urine was toegevoegd, werd gemiddeld 77% teruggevonden.

In tegenstelling tot de methode van Neher wordt bij deze methode het aldosterongehalte bepaald door een objectieve meting.

Door het aldosteron om te zetten in het diacetaat kan met de methode van Ayres een heel goede scheiding worden verkregen van cortison en cortisol. Bij de acetylering worden deze steroiden omgezet in het monoacetaat. Deze monoacetaten hebben veel sterkere polaire eigenschappen dan het aldosterondiacetaat.

Bezwaren

Aan de methode van Ayres zijn echter de volgende bezwaren verbonden:

1. Door de vele bewerkingen in deze methode zeer tijdrovend.
2. Het gebruik van radioactief materiaal vereist een kostbare apparatuur. Bovendien is radioactief cortisol niet gemakkelijk te verkrijgen.
3. De fluorescentie-reactie met loog differentieert niet tussen de verschillende Δ^4 3 ketosteroiden.
   Het blijft dus mogelijk dat met deze methode ook andere Δ^4 3 ketosteroiden worden bepaald.

Hoofdstuk IV

OVERZICHT VAN EIGEN METHODIEK

Inleiding

Op blz. 15 werd reeds uiteengezet waarom bij de colorimetrische bepaling van aldosteron de voorkeur werd gegeven aan de reactie met 2,4 dinitrophenylhydrazine.

Voordat deze reactie kan worden toegepast moet het aldosteron uit de urine worden geëxtraheerd en vervolgens gezuiverd.

De bepalingsmethode van aldosteron in urine, welke in dit hoofdstuk zal worden beschreven omvat dus de volgende bewerkingen:

a. hydrolyse en extractie van de aldosteronfractie uit de urine;
b. afscheiding van de aldosteronfractie door
   1. verdeling tussen twee vloeistofphasen
   2. papierchromatografie
c. colorimetrische bepaling door een objectieve meting van de kleur gevormd door het reactieproduct van aldosteron met 2,4 dinitrophenylhydrazine.

Om het verband tussen de verschillende onderdelen van de bepalingsmethode te verduidelijken, menen wij, dat een beschrijving van de methode en de gebruikte reagentia aan de bespreking van de diverse bewerkingen moet voorafgaan.

Reagentia

Voor de extractie en de zuivering van het extract:

Chloroform: Deze wordt gezuiverd door destillatie over natriumcarbonaat en in een bruine fles bewaard.

1 N NaOH
0.1 N NaOH

Voor de zuivering van het chloroformresidu:

Tolueen, petroleumaether (kp 80-100°C), methanol, gedestilleerd water in een volumeverhouding 5 : 5 : 7 : 3.

Systemen voor de papierchromatografische scheiding:

1. Tolueen, n-octanol, methanol en gedestilleerd water in een volumeverhouding 98 : 2 : 50 : 50.

II. Tolueen, petroleumaether (Kp 80-100° C), methanol en gedestilleerd water in een volumeverhouding 5 : 5 : 7 : 3.

Filtreerpapier:

Bij de papierchromatografie wordt Whatman No 1 papier gebruikt. Het papier dat gebruikt wordt bij de tweede chromatografie wordt gedurende 3 uur in een Soxhlet-apparaat met aethanol geëxtraheerd. Per 500 ml aethanol wordt ca 50 mg 2,4 dinitrophenylhydrazine en 5 ml verdund zwavelzuur toegevoegd.

Oplossing van cortison en cortisol:

5 mg cortison en 5 mg cortisol worden opgelost in 50 ml 96% aethanol.

Tetrazoliumoplossing:

5 mg triphenyltetrazoliumchloride wordt opgelost in 50 ml 8% NaOH. Deze oplossing wordt voor het gebruik vers bereid.

Alkohol:

Voor de extractie van de aldosteronfractie van het papier wordt gezuiverde alkohol gebruikt. Deze wordt verkregen door destillatie van 96% alkohol waaraan per 500 ml 50 mg 2,4 dinitrophenylhydrazine en 5 ml verdund zwavelzuur is toegevoegd.

Voor de kleurreactie:

1. 2,4 dinitrophenylhydrazine-reagens: 20 mg 2,4 dinitrophenylhydrazine wordt opgelost in 10 ml verdund zwavelzuur (10 ml geconcentreerd zwavelzuur aangevuld met water tot 100 ml). Dit reagens wordt voor het gebruik vers bereid. Het 2,4 dinitrophenylhydrazine wordt uit butanol omgekristalliseerd.
2. Natriumbenzoaatoplossing: 7 gram Na-benzoaat wordt opgelost in 100 ml gedestilleerd water.
3. Wasvloeistof: 5 ml sterk zwavelzuur wordt met gedestilleerd water aangevuld tot 200 ml. Deze vloeistof wordt verzadigd met benzoezuur, waarna 2 druppels „Lodaline" worden toegevoegd.
4. Alkoholische NaOH-oplossing: 3 gr NaOH wordt opgelost in 100 ml 50% aethanol.

Ontwikkelaar voor Dalco documentcontactpapier:

In 1 liter gedestilleerd water wordt opgelost:
1,2 gr Metol
25 gr Natriumsulfiet sicc.

6 gr Hydrochinon
30 gr Natriumcarbonaat sicc.
1 gr Kaliumbromide.

a. *Hydrolyse en extractie:*
De urine wordt gedurende 24 uur verzameld. De helft van deze 24 uurs-urine wordt met water tot 1 liter aangevuld. De verdunde urine wordt overgegoten in een 2 literfles, vervolgens met zout verzadigd en daarna met sterk zoutzuur op pH 1 gebracht.
Nu wordt 100 ml chloroform toegevoegd en 24 uur op een schudmachine geschud. Zoals in het schema op blz. 54 is aangegeven, wordt de chloroform gedurende deze tijd enkele malen ververst.
De chloroform welke van de urine is afgescheiden, wordt in de ijskast bewaard.

b. *Afscheiding van de aldosteronfractie:*
1. Zuivering van het chloroformextract.
Na het beëindigen van de extractie worden de verenigde chloroformextracten achtereenvolgens uitgeschud met 25 ml 1 N NaOH; 25 ml 0,1 N NaOH en twee maal met 25 ml van een verzadigde NaCl-oplossing.
De chloroform wordt gedurende minstens 3 uur gedroogd met Na_2SO_4, gefiltreerd en daarna onder vacuum ingedampt tot ca 1 ml. Het residu wordt met wat chloroform overgespoeld in een centrifugebuis van 10 ml en met persluchт drooggeblazen. Het residu wordt opgenomen in 2 ml 70% methanol en 2 maal uitgeschud met 0,5 ml van een 1 : 1 mengsel van tolueen en petroleumaether (kp 80-100° C). De koolwaterstoflaag wordt hierbij met een Pasteurse pipet verwijderd.
De methanollaag wordt hierna tot 5 ml aangevuld met 96% aethanol.

2. Papierchromatografische scheiding
0,5 tot 2,5 ml van de alkoholische oplossing wordt tot een klein volume ingedampt en quantitatief overgebracht op een papierchromatogram (fig. 4a). Op de controlestrook worden 10 µg cortison en 10 µg cortisol aangebracht.
Nadat het papier minstens 3 uur bij 28°C is geëquilibreerd met de damp van het chromatografiesysteem, wordt het chromatogram gedurende 4 uur ontwikkeld met het systeem I (zie reagentia). In dit systeem loopt aldosteron tussen cortisol en cortison. Nadat cortisol en cortison op de controlestrook zichtbaar zijn gemaakt door bespuiten met een alkalische triphenyltetrazoliumoplossing, kan de plaats waar het aldosteron zich op het chromatogram bevindt worden vastgesteld. Een stuk van 4 cm tussen corti-

Cortisol

Aldosteron

Cortison

Cortisol

Aldosteron

Cortison

Figuur 4. Contactafdrukken van papierchromatogrammen van

1 = urine extract
2 = 20 µg cortisol, 20 µg cortison
3 = 10 µg cortisol, 10 µg aldosteron, 10 µg cortison
Systeem: Tolueen:octanol:methanol:water (98:2:50:50)

1 = 5 µg aldosteron
2 = 5 µg cortisol, 5 µg
3 = urine extract cortison
Systeem: Tolueen:pet. aether: methanol:water (5:5:7:3)

sol en cortison wordt uitgeknipt en gedurende de nacht bij kamertemperatuur met aethanol geëlueerd. Nadat dit eluaat is geconcentreerd wordt het aangebracht op de startlijn van het tweede papierchromatogram (fig. 4b). Cortisol en cortison worden ook hier gebruikt als indicatoren, van elk van deze steroiden wordt op de controlestrook 5 µg aangebracht.
Na $1\frac{1}{2}$ uur equilibreren wordt dit chromatogram gedurende 6 uur ontwikkeld met het systeem II (zie reagentia).
Aldosteron loopt in dit systeem eveneens tussen cortisol en cortison. De plaats van het aldosteron op het 2e papierchromatogram wordt door middel van contactfotografie vastgesteld. Hiertoe wordt het chromatogram op een vel Dalco documentcontactpapier gelegd en 5 seconden met een Philips T.U.V. lamp van 15 Watt belicht. De afstand van de lamp tot het papier is hierbij 1 m.
Nadat de foto ontwikkeld is, zijn de steroiden welke U.V. licht absorberen, als witte banden te zien (fig. 4). Door te letten op de plaats van cortisol en cortison kan de plaats van het aldosteron op het chromatogram worden bepaald. Op deze wijze wordt ook een indruk verkregen van de grootte van de aldosteronvlek en van de aanwezigheid van andere U.V. licht absorberende stoffen.
Nu wordt 1,4 cm van het chromatogram tussen cortisol en cortison uitgeknipt en met 1 ml gezuiverde alkohol geëxtraheerd.

c. *Colorimetrische bepaling*
Het alkoholisch extract van de aldosteronfractie van het tweede papierchromatogram wordt in een centrifugebuisje met perslucht drooggeblazen. Het residu wordt opgelost in 0,1 ml gezuiverde aethanol, waarna 0,1 ml van het 2,4 dinitrophenylhydrazine reagens wordt toegevoegd. Vervolgens wordt 25 minuten verwarmd in een kokend waterbad. Het onoplosbare reactieproduct wordt gecopraecipiteerd met benzoezuur door 0,1 ml van een 7% natriumbenzoaatoplossing aan het zure reactiemengsel toe te voegen. Hierna wordt het neerslag twee maal uitgewassen met 2 ml wasvloeistof (zie reagentia). Het praecipitaat wordt hierbij door centrifugeren afgescheiden.
Het uitgewassen neerslag wordt opgelost in 1 ml alkoholische NaOH-oplossing. Van deze oplossing wordt nu de extinctiecurve tussen 380 en 600 mµ gemeten met een Beckman DU spectrophotometer.

Berekening

Voor de berekening van de aldosteronuitscheiding wordt de volgende formule gebruikt:

$$\mu g \text{ aldosteron per 24 uur} = \frac{Ext^{I}_{460} - Ext^{I}_{500}}{Ext^{st}_{460} - Ext^{st}_{500}} \times a \times \frac{10}{\text{ml extract}}$$

In deze formule is

Ext^{I}_{460} en Ext^{I}_{500}	de extinctie van de onbekende oplossing bij 460 en 500 mμ,
Ext^{st}_{460} en Ext^{st}_{500}	de extinctie van de aldosteronstandaard bij 460 en 500 mμ,
a:	de hoeveelheid aldosteron welke in 1 ml van de standaardoplossing aanwezig is (uitgedrukt in μg),
ml extract:	de hoeveelheid extract welke op het 1e chromatogram werd aangebracht.

Hoofdstuk V

BEREIDING VAN HET URINE-EXTRACT

a. Hydrolyse

Bij de bepaling van de „Sodium retaining factor" in de urine werd door Deming en Luetscher (1950) en Singer en Venning (1953) gevonden, dat meer biologisch actief materiaal met organische oplosmiddelen kon worden geëxtraheerd als de urine vóór de extractie op pH 1 was gebracht.

Wanneer de urine gedurende 24 uur bij pH 1 werd gehydrolyseerd kon aanmerkelijk meer aldosteron worden verkregen dan uit urine welke onmiddellijk na het aanzuren was geëxtraheerd (Luetscher 1954, Neher en Wettstein 1955, en Dyrenfurth 1956). Door Axelrad e.a. (1954, 1955), Luetscher en Axelrad (1954) en Venning e.a. (1954, 1956) werd geconstateerd, dat ook enzymatische hydrolyse met glucuronidase de opbrengst van aldosteron uit de urine verhoogde.

Deze waarnemingen wijzen er op dat aldosteron, evenals de meeste steroiden, in geconjugeerde toestand wordt uitgescheiden.

Ten einde een optimale hydrolysemethode te vinden voor de bepaling van aldosteron in urine werden door Luetscher (1955) en Neher en Wettstein (1955) verschillende methoden vergeleken.

Bij deze experimenten werd in het extract van porties urine van een aantal patienten het aldosterongehalte bepaald. De extracten werden bereid van:

a. urine met een pH 6-7
b. aangezuurde urine, 40 min. nadat deze op pH 1 was gebracht
c. aangezuurde urine, 24 uur nadat deze op pH 1 was gebracht
d. urine welke gedurende 48 uur bij pH 4,8 met glucuronidase was geincubeerd.

Uit deze proeven bleek, dat in alle gevallen de hydrolyse bij pH 1 gedurende 24 uur en kamertemperatuur de beste resultaten gaf.

Deze wijze van hydrolyse werd ook door ons bij dit onderzoek toegepast.

De experimenten van Tait (1957) en van Dyrenfurth en Venning (1957) hebben het waarschijnlijk gemaakt, dat aldosteron slechts voor een klein gedeelte als glucuronide wordt

uitgescheiden. Verder is van het aldosteron-conjugaat slechts bekend, dat het bij pH 1 wordt gehydrolyseerd.

b. Extractie

De meeste onderzoekers gebruiken voor de extractie van aldosteron uit de urine chloroform. Dit oplosmiddel heeft een aantal gunstige eigenschappen waardoor het goed te gebruiken is voor de extractie van steroiden:

1. De meeste steroiden zijn met chloroform gemakkelijk aan water te onttrekken.
2. Chloroform kan vrijwel zonder verwarming onder vacuum worden afgedestilleerd. Deze eigenschap maakt chloroform tot een geschikt extractiemiddel voor thermolabiele stoffen zoals aldosteron.
3. Chloroform is onbrandbaar. Hierdoor wordt het risico bij het werken met grote volumes oplosmiddel verminderd.

Volgens Simpson e.a. (1954) verliest aldosteron, dat gedurende 24 uur bij kamertemperatuur is opgelost in 0,1 N HCl, ca 20% aan biologische activiteit. Het leek ons dan ook wenselijk het aldosteron, dat door hydrolyse vrijkomt, direct aan de zure urine te onttrekken. Wij meenden dit te kunnen bereiken door de urine tijdens de hydrolyse met chloroform te schudden. Om ontleding van het geëxtraheerde aldosteron zo veel mogelijk tegen te gaan, wordt de chloroform tijdens de hydrolyse enige malen ververst. Het afgescheiden chloroformextract wordt in de ijskast bewaard tot verdere bewerking plaats vindt.

Een overzicht van de extractie is op blz. 54 in een schema weergegeven.

Maatregelen tegen emulsievorming

Wanneer urine met chloroform wordt geschud ontstaat vaak een dikke emulsie. Wanneer tijdens de hydrolyse de chloroform wordt ververst moet deze emulsie door centrifugeren worden gebroken. Daar het bezwaarlijk is enkele liters met chloroform geëmulgeerde urine te centrifugeren, werd getracht de emulsievorming tegen te gaan. Daar geconcentreerde urine de sterkste emulsievorming gaf, werd nagegaan in hoeverre door verdunning van de urine de emulsievorming kon worden voorkomen.

Indien de helft van een 24 uurs urine met water tot 1 liter werd aangevuld en daarna met keukenzout verzadigd, kon de vorming van een emulsie zover worden teruggedrongen dat de chloroform met behulp van een scheitrechter van de urine kon worden gescheiden.

Hoofdstuk VI

AFSCHEIDING VAN DE ALDOSTERONFRACTIE

a. Zuivering van het chloroformextract

Om een goede papierchromatografische scheiding te verkrijgen, is het gewenst dat het urine-extract zo min mogelijk verontreinigingen bevat.

Door extractie met loog kunnen zure componenten, waaronder phenolische steroiden en een groot deel van de urinepigmenten, worden verwijderd.

Om ontleding tijdens deze zuivering zo veel mogelijk tegen te gaan worden de chloroformextracten in de ijskast afgekoeld en daarna zo snel mogelijk met loog uitgeschud.

Wanneer de chloroformextracten worden uitgeschud met 0,1 N loog of 5% natriumcarbonaat ontstaat vaak een emulsie welke slechts door centrifugeren kan worden gebroken. Door uitschudden met 1 N loog worden naast vele pigmenten ook emulgerende slijmachtige stoffen aan de chloroform onttrokken. De loogphase kan hierna zonder bezwaar met een scheitrechter worden verwijderd.

Door een tweede extractie met 0,1 N loog kunnen eveneens nog wat pigmenten worden geëxtraheerd.

De chloroform kan snel van loogresten worden bevrijd door deze 2 maal uit te schudden met een verzadigde pekeloplossing.

Nadat de chloroform over Na_2SO_4 is gedroogd, wordt deze onder vacuum (waterstraalpomp) bij 30-40°C afgedestilleerd. Het aldus verkregen chloroformresidu is echter nog te onzuiver om aan een papierchromatografische scheiding onderworpen te kunnen worden. Een goede zuivering kon worden verkregen door een verdeling van het chloroformresidu tussen 70% methanol en een 1 : 1 mengsel van tolueen en petroleumaether. Een groot deel van de pigmenten welke in het chloroformresidu aanwezig zijn worden door het tolueen petroleumaethermengsel aan de alkohol onttrokken.

Bij een vorig onderzoek was reeds gebleken, dat met deze verdeling een goede zuivering van de 17 hydroxycorticosteroidenfractie uit serum kon worden verkregen. Wanneer cortison aan serum werd toegevoegd kon dit, na zuivering van het extract, vrijwel zonder verlies worden teruggevonden (Kassenaar e.a. 1955). Daar de Rf-waarde van aldosteron

en cortison bij chromatografie in het B1-systeem (= partitiemengsel) weinig verschillen, is het waarschijnlijk dat ook tijdens de verdeling aldosteron zich als het cortison zal gedragen. Om deze reden meenden wij deze verdeling ook bij de bepaling van aldosteron te kunnen gebruiken.

b. Papierchromatografie

Na toepassing van de reeds beschreven zuiveringen bevat het urine-extract naast het aldosteron nog een aantal stoffen welke, wat hun oplosbaarheid betreft, op aldosteron gelijken.

Van deze verontreinigingen hebben cortison en cortisol eveneens een kleine biologische activiteit op de Na- en K-huishouding. Daar aanvankelijk werd getracht aldosteron te bepalen door gebruik te maken van een biologische ijking, werd naar een papierchromatografiesysteem gezocht waarmee aldosteron van deze biologisch actieve stoffen kon worden gescheiden.

In tabel III is een overzicht gegeven van een aantal systemen voor papierchromatografie welke door verschillende onderzoekers werden toegepast bij de scheiding van aldosteron van cortison en cortisol.

Tabel III
Papierchromatografiesystemen voor de zuivering van de aldosteronfractie uit bijnierextracten en urine

Systeem	Auteur	Toegepast door	Positie van aldosteron op het papierchromatogram
Tolueen/propyleen glycol	Zaffaroni en Burton (1951)	Simpson e.a. (1952-1954) Mattox en Mason (1953) Luetscher en Johnson (1954) Neher en Wettstein (1955) Nowaczynski e.a. (1956) Gornall en Gwilliam (1957)	als cortison
Chloroform/formamide	Zaffaroni (1953)	Neher en Wettstein (1956)	als cortison
Benzeen/aethanol-water "B5"	Bush (1952)	Simpson en Tait (1953) Luetscher en Johnson (1954)	± tussen cortisol
Tolueen-aethylacetaat/methanol-water "C"	Bush (1952)	Simpson e.a. (1954) Neher en Wettstein (1955-1956)	als cortisol
Iso-octaan/tertiaire butanol-water E_2B	Eberlein en (1955)	Nowaczynski e.a. (1956)	boven cortison en cortisol

In principe maken vrijwel alle onderzoekers gebruik van een systeem van Zaffaroni om aldosteron van cortisol te scheiden. De aldosteronfractie wordt vervolgens van cortison gezuiverd door papierchromatografie in een Bush-systeem.

Na chromatografie met de systemen van Bush of Zaffaroni kan de plaats van het aldosteron op het papierchromatogram eenvoudig worden bepaald indien parallel cortison en cortisol worden gechromatografeerd.

Dit is niet het geval bij gebruik van de systemen van Eberlein en Bongiovanni (1955) en van Schmidt en Staudinger (1953, 1954). In deze systemen loopt aldosteron minder snel dan cortison en cortisol.

Aan de toepassing van de systemen van Zaffaroni zijn de volgende bezwaren verbonden:

a. Het filtreerpapier moet met de stationaire phase worden geimpregneerd. Deze bewerking is technisch moeilijk te verwezenlijken.
b. De aldosteronfractie is na elutie met propyleenglycol resp. formamide verontreinigd.
c. Het tolueen/propyleen glycol systeem vereist een lange ontwikkelingstijd (minstens 48 uur). Dit bezwaar geldt niet voor het chloroform/formamide systeem (ontwikkelingstijd $2\frac{1}{2}$-3 uur).

Een voordeel van deze systemen is echter, dat met deze systemen sterk verontreinigde extracten kunnen worden gechromatografeerd.

De papierchromatografiesystemen van Bush zijn gemakkelijker te hanteren:

a. Het filtreerpapier wordt in de chromatografietank met de damp van het vloeistofmengsel geëquilibreerd.
b. Daar laagkokende oplosmiddelen worden gebruikt drogen de chromatogrammen, na beëindiging van de papierchromatografie, snel.
c. De ontwikkelingstijd bedraagt slechts enkele uren.

Bij de keuze van een papierchromatografiesysteem werd dan ook de voorkeur gegeven aan een Bush-systeem.

Tijdens een orienterend experiment werd gevonden dat op een papierchromatogram dat ontwikkeld was met het systeem B4 (Tolueen/methanol-water) aldosteron zich tussen cortisol en cortison bevond. Daar reeds gevonden was dat aldosteron zich op dezelfde wijze gedroeg in het B5-systeem (tabel III) leek het mogelijk door één maal papierchromatografie toe te passen, aldosteron van cortison en cortisol te scheiden.

Bij de chromatografie van urine-extracten met deze systemen ondervonden wij echter de moeilijkheid dat de mobile phase lange tijd nodig had om door de plaats waar het extract op papier was gebracht heen te komen. Als gevolg hiervan liepen de papierchromatogrammen onregelmatig, waardoor een juiste localisering van de aldosteronfractie moeilijk was.

Dit bezwaar kon worden ondervangen door aan de mobiele phase van het systeem B4 2% n-octanol toe te voegen.

Op deze wijze werd een papierchromatografiesysteem verkregen dat de volgende gunstige eigenschappen bezit:

a. Eenvoudige localisatie van aldosteron.
   Ook na toevoeging van n-octanol aan het B4 systeem loopt aldosteron tussen cortisol en cortison. De Rf-waarden van cortisol, aldosteron en cortison zijn in dit systeem resp. 0,32, 0,41 en 0,51.
b. Geen storing door ballaststoffen.
   Zonder bezwaar kunnen sterk verontreinigde extracten worden gechromatografeerd. Op het chromatogram bevinden zich tussen cortisol en cortison relatief weinig U.V. absorberende verontreinigingen.
c. Korte tijd van ontwikkeling.
   Reeds na 4 uur chromatograferen wordt 20 µg aldosteron goed gescheiden van 20 µg cortisol en 20 µg cortison (fig. 4).

Na de uitwerking van de kleurreactie met 2,4 dinitrophenylhydrazine werd nagegaan of deze reactie kon worden toegepast op de aldosteronfractie welke door papierchromatografie met het gewijzigde B4 systeem uit het urine-extract was afgezonderd.

Het absorptiespectrum van het reactieproduct van de aldosteronfractie en 2,4 dinitrophenylhydrazine verschilde echter sterk van het absorptiespectrum dat werd gemeten na toepassing van de kleurreactie op zuiver aldosteron. Verder bleek dat op de plaats waar het aldosteron zich op het chromatogram bevond een stof aanwezig was welke een blauwe kleur gaf in ammoniakdamp nadat het chromatogram met een 2,4 dinitrophenylhydrazine-oplossing bespoten was.

Nu werd nagegaan of de aldosteronfractie met één van de reeds beschreven systemen voor papierchromatografie van de storende stof kon worden gescheiden.

In de systemen B5 en C van Bush en het E_2B-systeem gedroeg de onbekende stof zich als aldosteron.

Een goede scheiding werd verkregen met het B1-systeem van Bush (Tolueen-ligroine/methanol-water). In dit systeem bleek aldosteron eveneens tussen cortison en cortisol te lopen (tabel IV).

Tabel IV
Rf-waarden in het B1-systeem

Cortisol	0,03
Aldosteron	0,05
Cortison	0,08
Onbekende	0,13

Door de aldosteronfractie, welke na chromatografie met het gewijzigde B4-systeem werd verkregen, nog eens te zuiveren met het B1-systeem werd bereikt:

a. Scheiding van de storende stof.
b. Scheiding van kleine hoeveelheden cortison en cortisol, welke na de eerste papierchromatografische zuivering de aldosteronfractie nog zouden kunnen verontreinigen.
c. Vergroting van de specificiteit van de bepalingsmethode, doordat nu de kleurreactie wordt toegepast op een fractie welke zich in twee verschillende papierchromatografiesystemen als aldosteron gedraagt.

Hoofdstuk VII

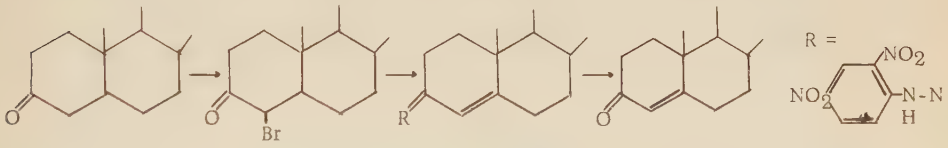
COLORIMETRISCHE BEPALING

1. Toepassing van 2,4 dinitrophenylhydrazine

Voor de afscheiding, zuivering en identificatie van carbonylverbindingen is al vele jaren van 2,4 dinitrophenylhydrazine gebruik gemaakt.

Ook in de steroid-chemie werd dit reagens op vele manieren toegepast.

Bij de synthese van Δ^4 3 ketosteroiden werd door Mattox en Kendall (1951) en Djerassi en Ryan (1949) van 2,4 dinitrophenylhydrazine gebruik gemaakt bij de invoering van de dubbele band tussen C_4 en C_5 (fig. 5).



Figuur 5

Verschillende androgenen werden gescheiden door kolomchromatografie van de 2,4 dinitrophenylhydrazonen (Johnston 1947, Reich e.a. 1952).

Klein e.a. (1948) beschreven een methode om progesteron als 2,4 dinitrophenylhydrazon gravimetrisch te bepalen.

Gornall en Macdonald (1953) werkten een methode uit om ketosteroiden colorimetrisch te bepalen als 2,4 dinitrophenylhydrazon. Bij dit onderzoek bleek, dat de carbonylgroepen in het steroidmolecule in verschillende mate met het 2,4 dinitrophenylhydrazine reageren. Na 5 minuten bij 20°C werden alleen de Δ^4 3 ketosteroiden volledig in het mono 2,4 dinitrophenylhydrazon omgezet. Wanneer de reactie werd uitgevoerd bij 60°C werd na 90 minuten eveneens een min of meer volledige reactie verkregen met andere carbonylgroepen.

Verder bleek de plaats van de carbonylgroep in het steroidmolecule van invloed te zijn op de golflengte van maximale absorptie van het 2,4 dinitrophenylhydrazon.

Door meting van de absorptiespectra van de 2,4 dinitro-

phenylhydrazonen van verschillende ketosteroiden kon de golflengte van maximale absorptie voor de 2,4 dinitrophenylhydrazonen van de verschillende carbonylgroepen in het steroidmolecule worden afgeleid. Als oplosmiddel werd door Gornall alkoholische loog gebruikt. Ter vergelijking zijn in tabel V ook de resultaten vermeld welke door Djerassi en Ryan (1949) en Reich e.a. (1953) werden verkregen. Deze auteurs gebruikten chloroform als oplosmiddel.

Tabel V
Golflengte van maximale absorptie van verschillende carbonylgroepen in het steroidmolecule

Carbonylgroep	Oplosmiddel	
	chloroform	alkoholisch loog
C_3 keton	367-369 mμ	430-435 mμ
Δ^4 C_3 „	390 mμ	450-455 mμ
C_{20} „	367-369 mμ	440 mμ
C_{17} „	367-369 mμ	425-430 mμ
C_{20} „	-	495-500 mμ
Δ^4 C_3 „	380 mμ	450-455 mμ
C_{20} „		
Δ^4 C_3 „ C_{17} OH	-	475 mμ
C_{20} „ C_{21} OH		

Uit deze tabel blijkt, dat de absorptiemaxima van de 2,4 dinitrophenylhydrazonen, bepaald in alkoholisch loog, meer verschilden dan die, welke werden gemeten in een chloroform oplossing. Verder is te zien, dat wanneer meer dan één carbonylgroep aanwezig is, het absorptiemaximum tussen de maxima der afzonderlijke carbonylgroepen wordt gevonden. Opmerkelijk is dat door een OH-groep aan C_{21} het absorptiemaximum van het C_{20} - 2,4 dinitrophenylhydrazon 50 tot 60 mμ wordt verplaatst.

2. Verwijdering overmaat reagens

Wanneer 2,4 dinitrophenylhydrazine wordt gebruikt als reagens bij een colorimetrische bepaling is het noodzakelijk de overmaat van dit sterk gekleurde reagens van het reactieproduct te scheiden. Voor deze scheiding werden door Reich e.a. (1952, 1953) een drietal methodes beschreven:

a. Oxydatie van de overmaat 2,4 dinitrophenylhydrazine met het reagens van Benedict tot m dinitrobenzeen. Hierna wordt het hydrazon door chromatografie over een Al_2O_3-kolom gezuiverd.

b. Omzetting van de overmaat reagens tot aceton-2,4 dinitrophenylhydrazon. Het aceton-derivaat is i.t.t. het reagens goed door kolomchromatografie van het steroid-2,4 dinitrophenylhydrazon te scheiden.
c. Omzetting van de overmaat reagens tot pyrodruivenzuur-2,4 dinitrophenylhydrazon. Het pyrodruivenzuurderivaat kan dan door verdeling tussen chloroform en een Na_2CO_3-oplossing van het steroid-2,4 dinitrophenylhydrazon worden gescheiden.

Voor de bepaling van aldosteron in urine is het gebruik van deze methodes echter bezwaarlijk.

a. Het is zeer waarschijnlijk, dat bij de oxydatie van de overmaat 2,4 dinitrophenylhydrazine met het reagens van Benedict de aldosteronfractie eveneens wordt omgezet.
b. Bij een zuivering door middel van kolomchromatografie is de aldosteronfractie moeilijk te localiseren, zodat er een kans bestaat dat deze fractie geheel of gedeeltelijk verloren gaat.
c. Door het gebruik van aceton of pyrodruivenzuur bij de verwijdering van de overmaat van het reagens kan de aldosteronfractie gemakkelijk verontreinigd worden.

Door Gornall en Macdonald (1953) worden ketosteroiden met 2,4 dinitrophenylhydrazine bepaald door spectrophotometrische analyse van het reactieproduct in alkoholisch loog. Hierbij wordt de overmaat reagens door de loog ontleed. Door deze procedure wordt echter een zeer hoge achtergrondkleur verkregen. Het is daarom noodzakelijk de hoeveelheid reagens uiterst nauwkeurig te doseren.

Bij de bestudering van de reactie tussen corticosteroiden en 2,4 dinitrophenylhydrazine bemerkten wij, dat het reactieproduct zo onoplosbaar was in water, dat reeds enkele µg een neerslag vormden. Nu werd getracht dit neerslag van de overmaat reagens te scheiden door het met water uit te wassen. Dit leidde echter niet tot reproduceerbare resultaten. Triplo bepalingen, waarvan de Δ niet meer bedroeg dan 4%, konden worden verkregen door het neerslag, voordat dit werd uitgewassen, te fixeren met benzoezuur. Dit kon worden bereikt door aan het zure reactiemengsel Na-benzoaat toe te voegen. De wasvloeistof moest nu zo worden gekozen, dat het neerslag

a. zich goed door centrifugeren liet afscheiden,
b. geen reagens adsorbeerde.

ad a. Als wasvloeistof wordt een verzadigde oplossing van benzoezuur in ongeveer 1 N zwavelzuur gebruikt. Aan deze oplossing moeten enkele druppels „wetting agent" worden toegevoegd om te voorkomen dat een gedeelte van het neerslag, ook na centrifugeren, op de vloeistof blijft drijven. Het afwasmiddel „Lodaline" bleek voor dit doel uitstekend te voldoen.

ad b. In tabel VI is de extinctie bij 460 mμ gegeven van het overblijvende reagens, nadat dit, na toevoeging van Na-benzoaat, verschillende malen is uitgewassen. Bij deze proef werd van een even grote hoeveelheid reagens uitgegaan als bij de kleurreactie wordt gebruikt.

Tabel VI

Extinctie bij 460 mμ van benzoezuur + reagens na verschillende malen uitwassen (oplossing in alkoholische loog)

0 x uitwassen	0,491
1 x „	0,083
2 x „	0,028
3 x „	0,022
4 x „	0,019

In deze tabel is te zien, dat na twee maal uitwassen een vrijwel kleurloze blanco kan worden verkregen.

3. Keuze van het oplosmiddel voor de meting van de kleur van het dinitrophenylhydrazon

Wanneer een alkoholische oplossing van het reactieproduct van een steroid met 2,4 dinitrophenylhydrazine met loog alkalisch wordt gemaakt, zien we de kleur van de oplossing omslaan van geel naar purper tot violet.

Tabel VII

Invloed van het oplosmiddel op de golflengte van maximale absorptie van steroid-2,4 dinitrophenylhydrazonen

	Golflengte van maximale absorptie van een oplossing in	
	50 % alkohol	3 % NaOH in 50 % alkohol
17 OH Corticosteron	365 mμ	480 mμ
Testosteron	375 mμ	455 mμ
Androstaan 3 on 17 ol	370 mμ	435 mμ
Dehydroisoandrosteron'	360 mμ	430 mμ
Corticosteron	370 mμ	460 mμ
17 OH 11 desoxycorticosteron	375 mμ	470 mμ
Progesteron	370 mμ	450 mμ
Aldosteron	360 mμ	455 mμ

Uit de gegevens in tabel VII blijkt, dat door toevoeging van loog aan een oplossing van een 2,4 dinitrophenylhydrazon

a. het absorptiemaximum naar het zichtbare deel van het spectrum wordt verschoven. Hierdoor vereist de meting van het absorptiespectrum een minder kostbare apparatuur. Bovendien wordt in dit golflengtegebied het absorptiespectrum minder door verontreinigingen gestoord dan in het gebied tussen 300 en 400 mμ.
b. de specificiteit van de bepaling groter wordt daar de absorptiemaxima van de verschillende steroiden in alkalisch milieu verder uit elkaar liggen.

De kleur van het 2,4 dinitrophenylhydrazon wordt door Gornall in alkohol van 85-90% gemeten.

Door de toepassing van benzoezuur bij de verwijdering van het reagens moest een lagere alkoholconcentratie gebruikt worden, daar anders in alkalisch milieu Na-benzoaat zou neerslaan.

De beste resultaten werden verkregen met ca 50% alkohol (96% alkohol : water = 1 : 1).

Het percentage loog dat bij de kleurontwikkeling werd gebruikt bleek tussen 1 en 10% van geen merkbare invloed te zijn op de hoogte en de vorm van de absorptiecurve. Met een oplossing van 3% NaOH in 50% alkohol konden zowel bij de meting in 1 ml als in 3 ml vergelijkbare waarden worden verkregen.

4. Vorming van het 2,4 dinitrophenylhydrazon

a. *reactietemperatuur*
Om een snelle reactie van 2,4 dinitrophenylhydrazine met de verschillende carbonylgroepen van het steroidmolecule te verkrijgen werd deze reactie door Gornall bij 60°C uitgevoerd. Uit practische overwegingen werd door ons de temperatuur tijdens de reactie op 100°C gesteld, daar deze temperatuur door middel van een kokend waterbad eenvoudig is te verkrijgen en constant te houden.

b. *de reactietijd*
Nu werd nagegaan hoelang moest worden verwarmd om optimale kleurontwikkeling te verkrijgen.
Hiertoe werden gelijke hoeveelheden van een steroid oplossing gedurende verschillende tijden met het reagens verhit, waarna de kleur van het reactieproduct werd gemeten.

Uit deze gegevens blijkt, dat de onderzochte steroiden, welke evenals het aldosteron, een Δ^4 3 ketogroep en een ketol configuratie bezitten, na ongeveer 25 minuten verwarmen een optimale reactie geven. Om deze reden werd de verhittingstijd op 25 minuten gesteld.

Tabel VIII
Invloed van de reactietijd op de maximale absorptie

Steroiden		Verhittingstijd in minuten				
		10	20	25	30	40
Cortison	Extinctie bij 480 mμ	0,295	0,328	0,332	0,322	0,295
Cortisol	„	0,308	0,315	0,330	0,285	0,294
11 desoxy-17 hydroxy corticosteron	Extinctie bij 470 mμ	0,268	0,304	0,308	0,284	0,236
Corticosteron	Extinctie bij 460 mμ	0,261	0,258	0,258	0,260	

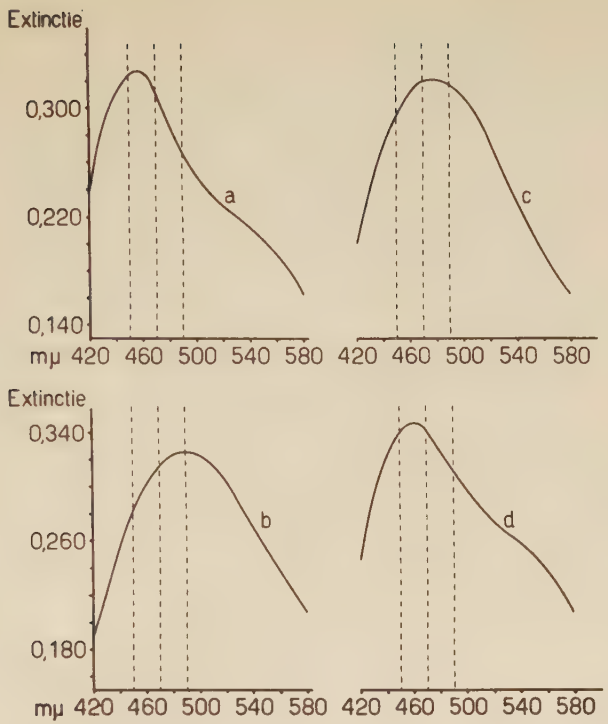
c. *Samenstelling van het reagens*

Van 16 steroiden werd gedurende 25 minuten bij 100°C het 2,4 dinitrophenylhydrazon gevormd. Hierbij werd de invloed nagegaan welke de zwavelzuur en 2,4 dinitrophenylhydrazine concentratie in het reagens uitoefende op de vorm van de extinctiecurve.

Bij dit experiment werd waargenomen, dat een verandering van de zwavelzuurconcentratie tussen 2 en 8 N en van de 2,4 dinitrophenylhydrazineconcentratie tussen 0,1 en 0,8%, geen merkbare invloed had op de vorm van de extinctiecurve van steroiden zonder een α ketol configuratie aan C_{17}.

Bij steroiden met een α ketol configuratie werd waargenomen, dat door verandering van de samenstelling van het reagens de vorm van de absorptiecurve kon worden beinvloed. Door verhoging van de concentratie van het 2,4 dinitrophenylhydrazine kon het absorptiemaximum worden verplaatst naar het blauwe deel van het spectrum, terwijl door verhoging van de zwavelzuurconcentratie een verschuiving van het absorptiemaximum naar het rode deel van het spectrum kon worden verkregen. Deze verschuiving van het absorptiemaximum bedraagt maximaal 10 mμ voor α ketolsteroiden zonder een 17 hydroxygroep. Bij steroiden, die naast de ketolconfiguratie ook een 17 hydroxygroep hebben, kan de verschuiving van het absorptiemaximum 30-40 mμ bedragen (zie fig. 6).

De concentratie van het zwavelzuur en de 2,4 dinitrophenylhydrazine in het reagens werd nu zo gekozen, dat een



Figuur 6. Extinctiecurves van het reactie product van 10 μg 17 hydroxycorticosteron en 2,4 dinitrophenylhydrazine bereid bij verschillende reagens en zwavelzuur concentraties.
a. 0,2% 2,4 dinitrophenylhydrazine in 1 N zwavelzuur
b. 0,2% „ „ 8 N „
c. 0,2% „ „ 4 N „
d. 0,8% „ „ 4 N „

absorptiecurve voor cortison en cortisol werd verkregen, waarvan de extinctie bij 460 en 500 mμ even hoog was. Indien de aldosteronfractie met een van deze steroiden verontreinigd mocht zijn, wordt bij de berekening van het aldosterongehalte voor deze verontreiniging een correctie aangebracht.

Een bevredigende verklaring voor de verschuiving van de golflengte van maximale absorptie onder invloed van veranderingen in de samenstelling van het reagens werd niet gevonden.

De volgende mogelijkheden werden overwogen:
De verschillen in de absorptiespectra worden veroorzaakt doordat, afhankelijk van de reactieomstandigheden

1. meer of minder 2,4 dinitrophenylhydrazine aan het 2,4 dinitrophenylhydrazon wordt geadsorbeerd. Deze adsorptie zou groter zijn naarmate bij de reactie minder zuur of meer 2,4 dinitrophenylhydrazine wordt aangewend.
   De vorm van de absorptiecurve kon echter niet worden beinvloed door het 2,4 dinitrophenylhydrazon in plaats van 2 maal, 4 maal uit te wassen. Verhoging van de zuurconcentratie in de wasvloeistof van 1 tot 4 N bleek op de vorm van de absorptiecurve evenmin effect te hebben.
2. meer of minder osazon wordt gevormd.
   Bij de reactie van Porter en Silber (1950) zouden 17 hydroxycorticosteroiden alleen in vrij sterk zwavelzuurmilieu met phenylhydrazine osazonen vormen.
   Daar werd waargenomen dat bij stijgende zuurconcentratie in het reagens het absorptiemaximum van 17 hydroxycorticosteroiden naar het rode deel van het spectrum werd verschoven, werd hier eveneens aan osazonvorming gedacht. Door verhoging van de concentratie van 2,4 dinitrophenylhydrazine in het reagens wordt een verschuiving van het absorptiemaximum naar het blauwe deel van het spectrum verkregen. Dit zou dan wijzen op een verminderde vorming van osazon. Deze veronderstelling lijkt echter in strijd met de wet van de massawerking.
   Het is echter niet uitgesloten, dat door verhoging van het gehalte van het reductans 2,4 dinitrophenylhydrazine, de intramoleculaire oxydatie/reductie reacties, welke aan de osazonvorming voorafgegaan, worden beinvloed.

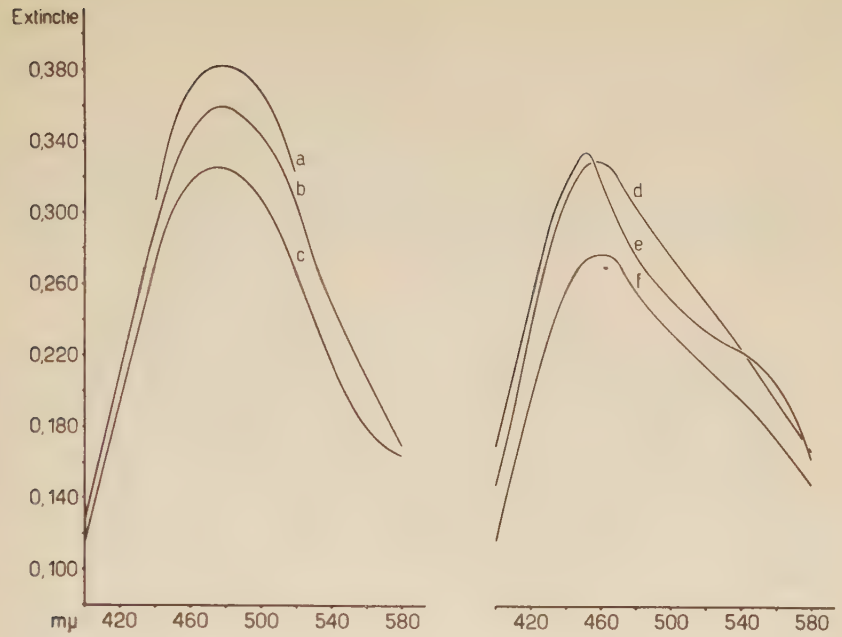
5. Toepassing van de kleurreactie op verschillende steroiden

In fig. 7 zijn de absorptiecurves getekend welke werden verkregen na toepassing van de kleurreactie op verschillende steroiden.
Deze curves werden als volgt ingedeeld:

I Δ^4 3 ketosteroiden met een ketolconfiguratie en een 17 OH groep.
II Δ^4 3 ketosteroiden met een ketolconfiguratie zonder een 17 OH groep.
III Δ^4 3 ketosteroiden zonder een ketolconfiguratie.
IV Steroiden zonder een Δ^4 dubbele band met een carbonylgroep aan C_3, C_{17} of C_{20}.

Over deze curves kan het volgende worden opgemerkt:

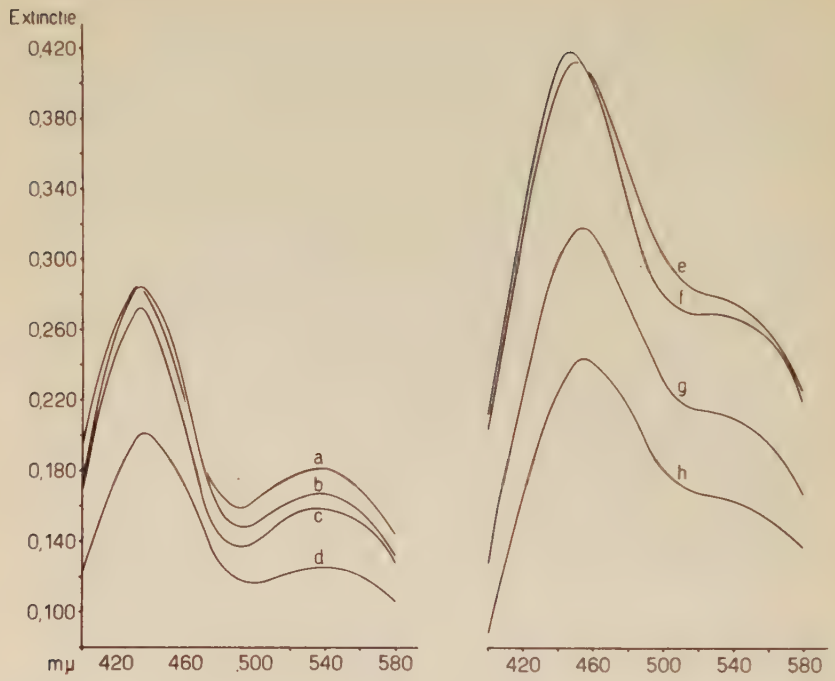
a. De moleculaire extinctie van de 2,4 dinitrophenylhydrazonen van steroiden met een ketolconfiguratie is aanmerkelijk hoger dan die van steroiden welke deze structuur missen.
b. De curves in iedere groep lijken sterk op elkaar, met uitzondering van die in groep II.



Figuur 7a. Absorptiecurve van het reactie product van 2,4 dinitrophenylhydrazine met

a = cortison	10 μ mol/ml
b = cortisol	"
c = 17 hydroxy-11-desoxycorticosteron	"
d = corticosteron	"
e = aldosteron	"
f = 11-desoxycorticosteron	"

c. De 17 OH corticosteroiden in groep I hebben een vrijwel symmetrische curve met een maximum bij 470-480 mμ.
d. Wanneer naast een ketolconfiguratie geen 17 OH groep voorkomt (groep II) vinden we een aantal overgangsvormen tussen de curves van groep I en groep III met maxima van 450 tot 470 mμ.
e. De vorm van de curves welke bijeen gebracht zijn in groep III maakt het waarschijnlijk, dat deze curves samenge-



Figuur 7b. Absorptiecurve van het reactie product van 2,4 dinitrophenylhydrazine met

a = dehydroisoandrosteron	20 μ mol/ml
b = androstanol 17 - on 3	„
c = cisandrosteron	„
d = Δ^5 pregnenol 3 - on 20	„
e = 17 hydroxyprogesteron	„
f = progesteron	„
g = Δ^4 androsteentrion 3,11,17	„
Δ^4 androstenol 11 - dion 3,17	„
h = testosteron	„

steld zijn uit twee toppen, bij resp. 450 en 540 mμ, welke elkaar gedeeltelijk overdekken.

f. De curves van groep IV hebben twee toppen, nl. één bij 430 en één bij 540 mμ. Deze toppen liggen zo ver uit elkaar, dat de curve een biphasische vorm krijgt.

Hoofdstuk VIII

TOEPASSING VAN DE KLEURREACTIE OP HET URINE-EXTRACT. BEREKENING VAN HET ALDOSTERONGEHALTE

Inleiding

In fig. 8-I zijn de absorptiespectra van het reactieproduct tussen 2,4 dinitrophenylhydrazine en de aldosteronfractie van een aantal urines weergegeven. Bij vergelijking van deze curves met die welke van zuiver aldosteron werd verkregen, blijkt dat het absorptiemaximum bij dezelfde golflengte werd gevonden. De vorm van de curves van de urine-extracten is echter niet in overeenstemming met de hoogte van het maximum. Wij veronderstelden, dat dit veroorzaakt werd doordat de curve van het aldosteron gesuperponeerd was op de curve van een verontreiniging.

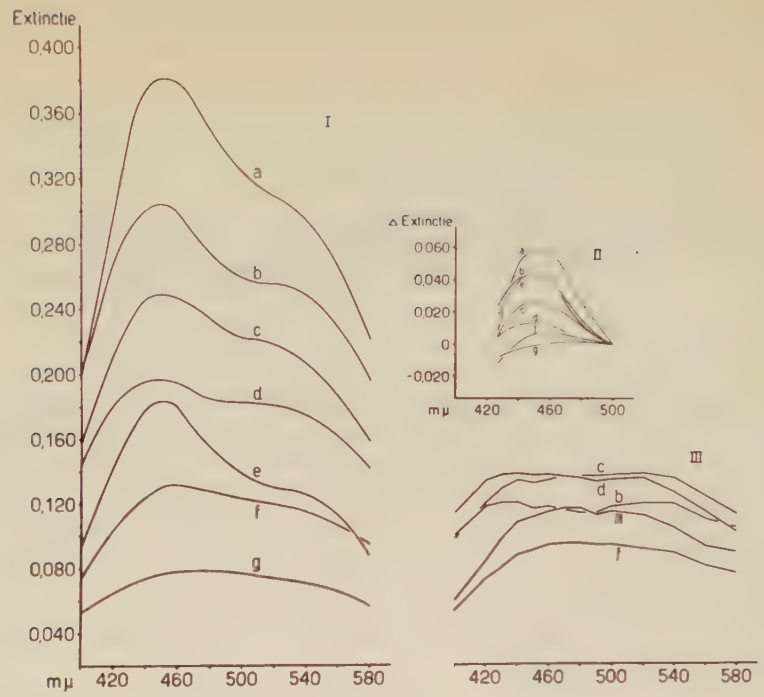
Er diende echter ook rekening te worden gehouden met de mogelijkheid dat de verkregen absorptiecurve geheel aan een andere stof moest worden toegeschreven. Wij verzochten daarom Simpson en Tait twee aldosteronfracties, welke door ons uit de urine waren afgescheiden, met hun chemische test te onderzoeken. Na acetylering van deze extractmonsters werd door Simpson en Tait een stof aangetoond welke in het B3-systeem van Bush dezelfde Rf-waarde had als het aldosterondiacetaat. Verder bleek deze stof het enige Δ^4 3 ketosteroide te zijn dat in de aldosteronfractie aanwezig was.

Nadat het nu waarschijnlijk was geworden dat de geïsoleerde fractie inderdaad aldosteron bevatte, werd nagegaan hoe de verontreinigingen in deze fractie geëlimineerd konden worden.

Een verdere zuivering van de aldosteronfractie door middel van papierchromatografie had naar onze mening de volgende bezwaren:

a. Het is niet waarschijnlijk dat een volledige scheiding van de verontreinigingen bereikt kan worden door invoering van een derde papierchromatogram.
b. Door uitbreiding van de papierchromatografie wordt de tijd welke voor een bepaling nodig is, aanmerkelijk verlengd.
c. Door meer bewerkingen toe te passen wordt het risico dat aldosteron verloren gaat vergroot.

Daar het mogelijk bleek te zijn bij de berekening van het aldosterongehalte voor de verontreiniging een correctie aan te brengen, werd van een verdere zuivering afgezien.



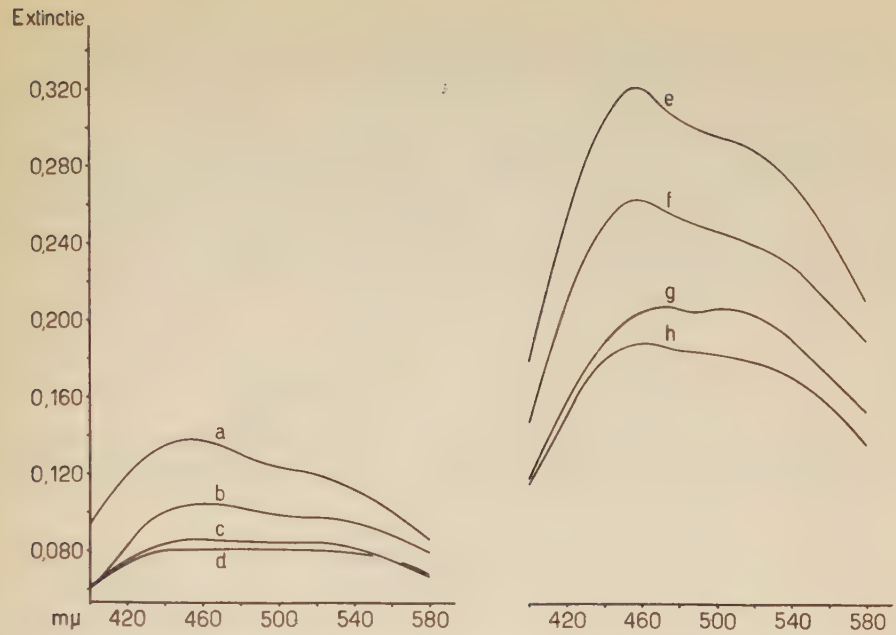
Figuur 8 I Absorptiecurves van aldosteronfracties uit verschillende urines (a, b, c, d, f, g).
Absorptiespectrum van aldosteron (e).
II Curves van fig. 8 I met basislijn getrokken door de extinctiewaarde bij 500 mμ.
III Absorptiecurves van de achtergrondkleur welke uit de curves genoemd onder I werden geconstrueerd.

Berekening van het aldosterongehalte van urinefracties door toepassing van een correctieformule

Voor de uitwerking van een correctieformule was het nodig dat de vorm van de absorptiecurve van de verontreinigingen werd bepaald. Verder moest worden nagegaan of de achtergrondkleur *) bij verschillende urines wisselde. Daar het niet mogelijk is van elk extract door een directe meting de absorptiecurve van de achtergrondkleur te bepalen, werd getracht deze als volgt te benaderen:

a. In fig. 8-I geeft curve g de extinctie weer van de aldosteronfractie uit de urine van een bijnierloze patient. Daar het vrijwel zeker is dat de urine van deze patient geen aldosteron bevat, geeft de curve hier dus de extinctie van de achtergrondkleur weer.

*) Met „achtergrondkleur" wordt de kleur bedoeld welke door de verontreinigingen wordt veroorzaakt.



Figuur 9. a, b, c: absorptiecurves van de aldosteronfractie uit de urine van patient de W., gemeten op verschillende tijden.
d: berekende absorptiecurve van de achtergrondkleur van curve a.
e, f, h: absorptiecurves van de aldosteronfractie uit de urine van patient M., gemeten op verschillende tijden.
g: berekende absorptiecurve van de achtergrondkleur van curve e.

b. Bij de herhaling van een aantal bepalingen met een deel van de urine-extracten, werd in twee gevallen een curve verkregen welke aanmerkelijk lager was dan die, welke reeds eerder was gemeten. Dit wees er op dat door een onbekende oorzaak het aldosteron in deze extracten ontleedde. Daar na een week een curve werd gemeten welke sterk geleek op de onder a. genoemde curve, is de waarschijnlijkheid groot dat inderdaad het aldosteron in het extract was ontleed. Wij menen dan ook dat de curves d en h (fig. 9) eveneens een beeld geven van de curve van de achtergrondkleur.
c. In fig. 8-II zijn dezelfde curves als in fig. 8-I weergegeven, zodanig, dat de basislijn van de curve getrokken is door de extinctiewaarde bij 500 mμ. Het blijkt nu dat de extinctiecurves van de verschillende urine-extracten naderen tot de curve van de aldosteronfractie uit de urine van de bijnierloze patient.

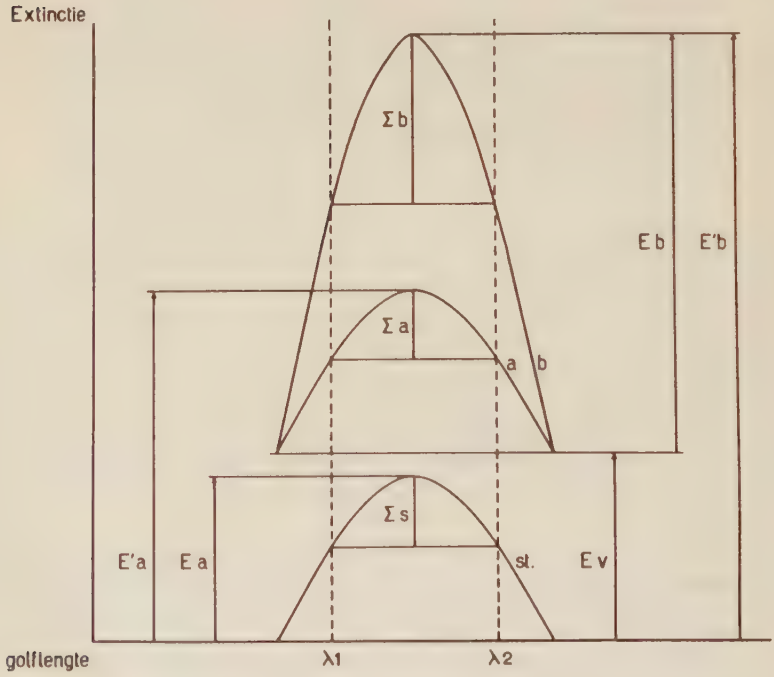
Op grond van deze waarnemingen werd aangenomen, dat de extinctiecurve van de achtergrondkleur tussen 460 en 520 mμ vrijwel evenwijdig liep aan de basis van de extinctiecurve.

Hierdoor is het mogelijk voor de achtergrondkleur bij de berekening van het aldosterongehalte een correctie aan te brengen. Hiertoe wordt de extinctie bij 460 mμ verminderd met de extinctie bij 600 mμ. Dit verschil wordt dan vergeleken met het extinctieverschil dat op dezelfde wijze uit een aldosteron-standaardcurve is berekend.

Afleiding van de correctieformule

In fig. 10 zijn schematisch de absorptiecurves getekend van oplossingen welke de volgende concentraties aan zuivere stof en verontreinigingen bevatten:

Curve	Concentratie zuivere stof	Concentratie verontreinigingen	Maximale extinctie
St	S	-	Ea
a	S	V	E'a
b	b	V	E'b



Figuur 10. Afleiding correctie formule.

De correctie op de tussen de golflengten λ_1 en λ_2 lineair verlopende invloed van de verontreinigingen wordt nu als volgt aangebracht: Door λ_1 en λ_2 worden lijnen getrokken evenwijdig aan de E-as. De snijpunten van deze lijnen met de extinctiecurves worden verbonden. Onafhankelijk van de afstand (Ev) waarover de curves a en b door de verontreinigingen verschoven worden geldt:

$$\varepsilon S = \varepsilon a$$

Tevens geldt:

$$\frac{E'a - Ev}{E'a - Ev - \varepsilon a} = \frac{E'b - Ev}{E'b - Ev - \varepsilon b}.$$

Door vermenigvuldiging van deze vergelijking met

$$\frac{(E'a - Ev - \varepsilon a)(E'b - Ev - \varepsilon b)}{E'a - Ev}$$

ontstaat de vergelijking

$$\frac{\varepsilon a}{\varepsilon b} = \frac{E'a - Ev}{E'b - Ev}$$

of

$$\frac{\varepsilon S}{\varepsilon b} = \frac{Ea}{Eb}.$$

Dit wil zeggen, dat het gehalte aan zuivere stof in de verontreinigde oplossing kan worden gevonden door de waarde van ε te betrekken op de ε-waarde van een standaardcurve van de zuivere stof.

Nu werd nagegaan of de veronderstelde absorptiecurve van de achtergrondkleur uit de curves van het urine-extract kon worden geconstrueerd. Hiertoe werd het aldosterongehalte berekend van een vijf en twintigtal willekeurig gekozen bepalingen en de aldosteroncurve, welke overeenkwam met de berekende hoeveelheid, geconstrueerd. Het verschil tussen de gemeten curve en de berekende curve zou nu de curve van de achtergrondkleur moeten weergeven.

In fig. 8-III zijn een aantal curves van de achtergrondkleur gegeven welke door berekening uit de curves van fig. 8-I werden afgeleid. Het golflengtegebied waarin de curve recht loopt, blijkt voor de verschillende curves te wisselen; tussen 460 en 500 mμ werd echter in ieder geval vrijwel een rechte gevonden.

Wanneer de berekening wordt toegepast op een absorptiecurve van het 2,4 dinitrophenylhydrazon van cortisol of

cortison, wordt een uitkomst van 0 verkregen doordat de extinctie bij 460 en 500 mμ een gelijke waarde heeft.

Bij een verontreiniging van de aldosteronfractie met deze steroiden wordt dus de absorptiecurve van aldosteron bij 460 en 500 mμ met een zelfde waarde verhoogd.

Door de berekening wordt dus tevens voor een verontreiniging met cortison en cortisol een correctie aangebracht. De wijze van berekenen kon als volgt worden getoetst:

Uit de urine van 2 patienten werd de aldosteronfractie geisoleerd. Van iedere fractie werd in de helft het aldosterongehalte bepaald, terwijl de andere helft naar Simpson en Tait werd gezonden voor een analyse met de methode welke in hoofdstuk III is beschreven.

De resultaten waren:

	Eigen methode	Simpson/Tait
Patient I	0,6 μg	0,5 μg
Patient II	4,1 μg	3,6 μg

Met de bepalingsmethode van Simpson en Tait werden dus vrijwel dezelfde waarden gevonden als met de door ons uitgewerkte kleurreactie en berekening.

Hoofdstuk IX

RESULTATEN

De bepaling van aldosteron in urine, welke in de vorige hoofdstukken werd besproken, is reeds gedurende een jaar in het laboratorium van de afdeling voor stofwisselingsziekten en endocrinologie van het Academisch Ziekenhuis te Leiden toegepast. In deze tijd werden ongeveer 170 bepalingen verricht o.a. bij verschillende balansstudies. Bij deze experimenten bleek de bepalingsmethode aan de eisen welke aan een klinische bepaling gesteld worden, te voldoen.

Door gebrek aan zuiver aldosteron was het niet mogelijk recovery-experimenten uit te voeren. Wanneer wij echter de waarden welke gevonden werden bij gezonde personen (tabel IX) vergelijken met die welke door verschillende auteurs werden opgegeven (tabel X), blijkt, dat het verlies dat tijdens de zuivering van de aldosteron bevattende fractie optreedt, zeker niet groter is dan bij andere in de literatuur beschreven methodes.

Tabel IX

Hoeveelheid aldosteron, uitgedrukt in µg/24 uur, welke in de urine van gezonde personen werd gevonden

Mannen			Vrouwen		
Ch	6		Ba I	3	
Es	6	60 jaar	Bu I	3	
Ka	6		La	3	
Mo I	6		Ol	4	
Co	7		Ba II	4	
Br	7		Lu	4	
Mo II	10		Ke	5	
Gr	13		Bu II	5	
Am	13		La	6	
Be	5	5 jaar	Po	6	60 jaar
Hi	3	3 jaar	Al	7	
			Vo	8	
			Ma	3	7 jaar
			Me	3	9 jaar

De personen waarvan de leeftijd niet is aangegeven, waren 20 tot 40 jaar oud.

Tabel X
In de literatuur vermelde hoeveelheid aldosteron, welke werd gevonden in de urine van gezonde personen

Auteur	Methode	µg aldosteron/24 uur
Luetscher en Axelrad 1954	Biologische ijking	1.6 - 3.0
Venning e.a. 1956	" "	0.8 - 6.8
Neher en Wettstein 1956	Chemische bepaling	1 - 9 (0.5-12.5)
Ayres e.a. 1956	" "	4.6 - 18.9

In tabel XI zijn de resultaten weergegeven welke werden verkregen door in de urine van een aantal personen het aldosterongehalte in duplo te bepalen.

De bepalingen in de urine van de patienten Ek en Me maken deel uit van een klinische studie waarbij de invloed van zoutonthouding en de toediening van ACTH op de aldosteronuitscheiding werd nagegaan.

Tabel XI
Duplobepalingen van aldosteron in urine

Naam	µg aldosteron/24 uur I	II
Me	2	2
Fr	2	3
Ba	3	4
Ba	4	4
Vr	4	5
Es	5	7
Me	6	8
Ek	6	10
Ek	7	7
Me	7	7
Me	7	8
Me	7	5
Me	10	7
Hu	10	10
Me	10	13
Me	11	13
Me	13	15
Me	13	16
Ek	13	18
Ek	15	14
St	20	20
Me	20	20
Br	25	18
Ek	34	24
Bo	46	51

Bij de beoordeling van de resultaten welke met de aldosteronbepaling werden verkregen, dient rekening gehouden te worden met het feit, dat een uiterst geringe hoeveelheid aldosteron moest worden afgescheiden uit een gecompliceerd mengsel van grotendeels onbekende stoffen. Wij zijn dan ook van mening dat de resultaten, welke, ondanks de vele bewerkingen, werden verkregen, bevredigend zijn te noemen.

SAMENVATTING

In hoofdstuk I werden de onderzoekingen vermeld welke leidden tot de ontdekking van het aldosteron. Bij de bestudering van de functie van het aldosteron bij de regulering van de electrolyt en waterhuishouding in het lichaam en bij het onderzoek naar de factoren welke van invloed zijn op de afscheiding van aldosteron door de bijnieren, was het van belang over een bepalingsmethode van aldosteron in de urine te kunnen beschikken.

Daar aan de biologische bepalingsmethodes, welke in gebruik waren in de tijd dat dit onderzoek werd aangevangen, veel bezwaren verbonden waren, werd gezocht naar een colorimetrische bepalingsmethode.

Door Gornall werd gevonden dat diverse ketosteroiden met 2,4 dinitrophenylhydrazine reactieproducten vormden, waarvan de absorptiespectra, gemeten in alkoholische loog, onderling verschilden. Voor de bepaling van aldosteron in urine kon de specificiteit van deze reactie worden vergroot door deze toe te passen op de aldosteronfractie welke door papierchromatografie uit een urine-extract was afgescheiden.

In hoofdstuk V wordt de extractie van aldosteron uit de urine besproken. Het aldosteron wordt aan de urine onttrokken door deze 24 uur bij pH 1 met chloroform te extraheren.

Voor de zuivering van het chloroformextract wordt van twee systemen van Bush gebruik gemaakt. In hoofdstuk VI wordt beschreven hoe door een modificatie het B4-systeem geschikt kon worden gemaakt voor de chromatografie van urine-extracten welke uiteraard veel verontreinigingen bevatten.

Daar aldosteron in beide systemen tussen cortisol en cortison loopt, kan het aldosteron op het papierchromatogram worden gelocaliseerd zonder gebruik te maken van zuiver aldosteron.

In hoofdstuk VII wordt de techniek beschreven waarmee het reactieproduct van de aldosteronfractie met 2,4 dinitrophenylhydrazine van de overmaat reagens kan worden gescheiden.

Door toepassing van een formule kan uit de absorptiecurve van een oplossing van het reactieproduct in alkoholische loog het aldosterongehalte in de urine worden berekend.

Uit de resultaten welke in hoofdstuk IX worden vermeld, blijkt dat de hoeveelheid aldosteron welke in de 24 uurs urine van gezonde personen werd gevonden, in overeenstemming is met de hoeveelheid welke door andere onderzoekers werd opgegeven. Bij meer dan 170 aldosteronbepalingen bleek de methode te voldoen aan de eisen welke aan een klinische bepaling worden gesteld.

SUMMARY

In chapter I a number of investigations are discussed which resulted in the isolation and identification of aldosterone.

The necessity for a clinical applicable method for the determination of aldosterone in urine was put forward. Such a method is needed for the study of the function of this hormone in the regulation of the electrolyte and the water balance in humans and in investigations on the regulation of the production of aldosterone by the adrenal cortex. When the investigations reported on in this thesis were started only bioassay procedures for the determination of aldosterone were available. Since in our opinion many objections can be raised against the use of these methods, it was tried to develop a chemical test.

It had been found by Gornall that various ketosteroids give reaction products with 2,4 dinitrophenylhydrazine, with more or less specific absorption spectra, when these are measured in an alkaline ethanolic medium.

For the determination of aldosterone in urine the specificity of this reaction could be increased when applied to the aldosterone fraction from urine, which was obtained by paperchromatographic separation.

In chapter V the extraction of aldosterone from urine is discussed. The aldosterone containing fraction is isolated by a continuous extraction for 24 hours at pH 1 with chloroform. The chloroform extract is purified by paperchromatography in two Bush systems.

In chapter VI is described how the Bush B4 system is modified in such a way that it can be used for the paperchromatography of urinary extracts which contain a large amount of impurities.

Since the Rf of aldosterone in both systems is between the rf of cortisol and cortison, these two steroids can be used for the localization of aldosterone on the paperchromatogram.

In chapter VII the technique is described, which is used for the separation of the reaction product between the aldosterone fraction and 2,4 dinitrophenylhydrazine from the excess reagent. On page 54 the various steps used in our method for the determination of aldosterone in urine are summarized.

In chapter IX the results of the determination of the aldosterone content of urine from a number of normal individuals are given. These data are in accordance with the results from other investigators.

The determination with the method described above gave in our hands reliable results in the urines from more than 170 patients.

SCHEME OF THE DETERMINATION OF ALDOSTERONE

Day no.	time	
1	9 a. m.	24 hour urine is thawed and measured. half of urine is made up to 1 liter.
	11 a. m.	pH is adjusted to pH 1, and the urine is saturated with NaCl, and 100 ml. $CHCl_3$ are added, mechanical shaking until
	2 p. m.	$CHCl_3$ fraction is isolated and 100 ml. fresh $CHCl_3$ are added. mechanical shaking until
	5 p. m.	$CHCl_3$ fraction is isolated and 200 ml. fresh $CHCl_3$ are added, mechanical shaking until
2	9 a. m.	$CHCl_3$ fraction is isolated and 100 ml. fresh $CHCl_3$ are added, mechanical shaking until
	11 a. m.	Combined $CHCl_3$ extracts are washed once with 25 ml. 1 N NaOH once with 25 ml. 0.1 N NaOH twice with 25 ml. saturated NaCl solution $CHCl_3$ extracts are dried with Na_2SO_4 and are stored overnight in refrigerator.
3	9 a. m.	$CHCl_3$ extracts are filtered and chloroform is evaporated in vacuo. The residue is dissolved in 2 ml. 70 % methanol and extracted twice with 0.5 ml. of a 50:50 toluene - light petroleum mixture. The methanol solution is made up to 5 ml. with ethanol. This solution can be stored for some time in the refrigerator.
	5 p. m.	2 ml. of alcoholic solution are applied to Whatman N° 1 paper: The paper is hung in the chromatography tank and equilibrated overnight.
4	9 a. m.	Development of paperchromatogram is started.
	1 p. m.	Paperchromatogram is finished. The aldosterone fraction is localized, cut out and eluted with 2.5 ml. ethanol overnight.
5	9 a. m.	The extract of the chromatogram is concentrated to a small volume and the residue is applied to the paper, for the second chromatography. This paper is stored in the refrigerator overnight.
6	9 a. m.	The paper is put in chromatography tank and is equilibrated until
	10.30 a. m.	Development of chromatogram is started.
	14.30 p. m.	Paperchromatogram is finished. The aldosterone fraction is eluted with 1 ml. ethanol.
7		The colorimetric determination of the aldosterone content is performed on this extract.

LITERATUUR

Addison, F. : On the constitutional and local effects of disease of the supra-renal capsules. O. Highley, London, 1855.

Axelrad, B. J., Johnson, B. B., Luetscher, J. A. : J. clin. Endocr. Metab., 14, 783, 1954.

Axelrad, B. J., Cates, J. E., Johnson, B. B. : Brit. med. J., I, 196, 1955.

Ayres, P. J., Simpson, S. A., Tait, J. F. : Persconlijke mededeling, 1956.

Baumann, E. J., Kurland, S. : J. biol. Chem., 71, 281, 1926-1927.

Bush, I. E. : Biochem. J., 50, 370, 1952.

Chen, C., Tewell, A. : Fed. Proc., 10, 377, 1951.

Clark, I. : Nature, 175, 123, 1955.

Conn, J. W., Arbor, A. : J. Lab. clin. Med. 45, 6, 1955.
J. Lab. clin. Med. 45, 661, 1955.

Deming, G. B., Luetscher, J. A. : Proc. Soc. exp. Biol., 73, 71, 1950.

Djerassi, C., Ryan, E. : J. Am. chem. Soc., 71, 1000, 1949.

Dorfmann, R. I. : Physiol. Rev., 34, 138, 1954.

Dyrenfurth, I., Venning, E. H. : Endocrinology, 60, 136, 1957.

Eberlein, W. R., Bongiovanni, A. M. : Arch. Biochem. Biophys., 59, 90, 1955.

Gornall, A. G., Macdonald, M. P. : J. biol. Chem., 201, 279, 1953.

Gornall, A. G., Gwilliam, C. : Canad. J. Biochem. Physiol., 35, 71, 1957.

Grundy, H. M., Simpson, S. A., Tait, J. F. : Nature 169, 795, 1952.

Grundy, H. M., Simpson, S. A., Tait, J. F., Woodford, W. : Acta endocr., 11, 199, 1952.

Ham, E. A., Harman, R. E., Brink, N. G., Sarett, L. H. : J. Amer. chem. Soc., 77, 1637, 1955.

Harrop, G. A., Soffer, L. J., Nicholson, W. M., Straus, M. B. : J. exp. Med., 61, 839, 1935.

Hechter, O., Pincus, G. : Physiol. Rev., 34, 459, 1954.

Johnson, B. B. : Endocrinology, 54, 196, 1954.

Johnston, C. P. : Science, 106, 91, 1947II.

Kahnt, F. W., Neher, R., Wettstein, A. : Helv. chim. acta, 38, 1237, 1955.

Kahnt, F. W., Neher, R., Wettstein, A. : Experientia 11, 446, 1955.

Kassenaar, A., Moolenaar, A. J., Nijland, J., Acta endocr., 18, 60, 1955

Klein, D., Weiner, N., Gordon, S. M.: Anal. Chem. 20, 174, 1948.
Loeb, R. F.: Science, 76, 420, 1932.
Loeb, R. F., Atchley, D. W., Benedict, E. M., Leland, J.: J. exp. Med., 57, 775, 1933.
Luetscher, J. A., Deming, G. B., Johnson, B. B.: Ciba Found. Coll. Endocr., 4, 530, 1952.
Luetscher, J. A., Johnson, B. B.: J. clin. Invest., 32, 585, 1953.
Luetscher, J. A.: J. clin. Endocr., 14, 1086, 1954.
Luetscher, J. A., Johnson, B. B.: J. clin. Invest., 33, 276, 1954.
Luetscher, J. A., Neher, R., Wettstein, A.: Experientia, 10, 456, 1954.
Luetscher, J. A.: Recent Progr. Hormone Res., 11, 214, 1955.
Luetscher, J. A., Dowdy, A., Harvey, J., Neher, R., Wettstein, A., J. biol. Chem., 217, 505, 1955.
Luetscher, J. A., Neher, R., Wettstein, A.: Experientia, 12, 22, 1956.
Mader, W. J., Buck, R. R.: Anal. Chem., 24, 666, 1952.
Mason, H. L.: Endocrinology, 25, 405, 1939.
Mattox, V. R., Kendall, E. C.: J. biol. Chem., 188, 287, 1951.
Mattox, V. R., Mason, H. L.: Proc. Mayo Clin., 28, 569, 1953.
Mattox, V. R., Mason, H. L., Albert, A.: Proc. Mayo Clin., 28, 545, 1953.
Mattox, V. R., Mason, H. L., Albert, A.: J. biol. Chem., 218, 359, 1956.
Moolenaar, A. J., Querido, A., An International Symposium on Aldosterone, pag. 1, J. & A. Churchill Ltd., 104 Gloucester Place, London W 1.
Moolenaar, A. J., Lancet 1956 II, 556
Moolenaar, A. J., Acta Endocrinologica, 25, 161, 1957.
Moolenaar, A. J., Ned. Tijdschr. v. Geneesk., 101, 1298, 1957.
Neher, R., Wettstein, A.: Acta endocr. 18, 386, 1955.
Neher, R., Wettstein, A.: J. clin. Invest., 35, 800, 1956.
Nowaczynski, W., Goldner, M., Genest, J.: J. Lab. clin. Med., 45, 818, 1955.
Pincus, G.: Ann. N. Y. Acad. Sci., 61, 283, 1955.
Porter, C. C., Silber, R. H.: J. biol. Chem., 185, 201, 1950.
Reich, H., Sanfilippo, S. J., Crane, K. F.: J. biol. Chem., 198, 713, 1952.
Reich, H., Crane, K. F., Sanfilippo, S. J.: J. org. Chem., 18, 822, 1953.
Romanoff, E. B., Hudson, P., Pincus, G.: J. clin. Endocr., Metab., 13, 1546, 1953.
Schmidlin, J., Anner, G., Billeter, J. R., Wettstein, A.: Experientia, 11, 365, 1955.
Schmidt, H., Staudinger, H. J.: Biochem. Z., 324, 128, 1953.

Schmidt, H., Staudinger, H. J.: Angew. Chem., 66, 711, 1954.
Simpson, S. A., Tait, J. F.: Endocrinology, 50, 150, 1952.
Simpson, S. A., Tait, J. F., Bush, I. E.: Lancet, 263, 226, 1952.
Simpson, S. A., Tait, J. F., Wettstein, A., Neher, R., v. Euw, J., Reichstein, T.: Experientia 9, 333, 1953.
Simpson, S. A., Tait, J. F., Wettstein, A., Neher, R., v. Euw, J., Schindler, O., Reichstein, T.: Helv. chim. acta, 37, 1163, 1954, idem, 37, 1200, 1954.
Simpson, S. A., Tait, J. F.: Ciba Found. Coll. Endocr., 8, 204, 1954.
Singer, B., Venning, E. H.: Endocrinology, 52, 623, 1953.
Sweat, M. L.: J. clin. Endocr. Metab., 15, 1043, 1955.
Swingle, W. W., Parking, W. H., Taylor, A. R., Hays, H. W.: Am. J. Physiol., 124, 27, 1938.
Tait, J. F., Simpson, S. A., Grundy, H. M.: Lancet, 262, 122, 1952.
Tait, J. F.: Voordracht Ciba Symposium, 1957.
Venning, E. H., Carballeira, A., Dyrenfurth, I.: J. clin. Endocr. Metab., 14, 784, 1954.
Venning, E. H., Dyrenfurth, I.: J. clin. Endocr. Metab., 16, 426, 1956.
Venning, E. H., Dyrenfurth, I., Girond, C. J P.: J. clin. Endocr. Metab., 16, 1326, 1956.
Wettstein, A., Kahnt, F. W., Neher, R.: Ciba Found. Coll. Endocr., 8, 170, 1954.
Zaffaroni, A., Burton, R. B., Keutmann, E. H.: Science, 111, 6, 1950.
Zaffaroni, A., Burton, R B.: J. biol. Chem., 193, 749, 1951.
Zaffaroni, A.: Recent Progr. Hormone Res., 8, 51, 1953.

STELLINGEN

1. Het is waarschijnlijk dat bij de reactie tussen 2,4 dinitrophenylhydrazine en steroiden met een 17β, 21 dihydroxy-20 keton configuratie, afhankelijk van de reactieomstandigheden een osazon kan worden gevormd.

   Dit proefschrift, pag. 39.

2. De toename van de ultravioletabsorptie van een aantal digitalis en strophantus glycosiden na koken met verdund zoutzuur, wordt niet veroorzaakt door sluiting van de lactongroep, doch door waterafsplitsing onder invoering van een dubbele band aan C_{14} en/of C_{16}.

   Langejan, M., Ac. Proefschrift, Utrecht 1950.
   Spijkers, J.B.F., Ac. Proefschrift, Utrecht 1953.
   Smithuis, A.L.O.M., Ac. Proefschrift, Utrecht 1955.

3. De chemische bepalingsmethode van von Euler (1951) voor adrenaline en nonadrenaline in urine is onbruikbaar.

   Von Euler, U.S., Annual of Surgery, 134, 929, 1951.

4. Langdurig overmatig gebruik van purgeermiddelen kan voeren tot een extreme vorm van Kalium verlies.

5. De „vereenvoudigde methode voor het opsporen van barbitalen in toxicologisch materiaal" van Huisman is aan bedenkingen onderhevig.

   Huisman, J.W., Pharm. Weekbl. 91, 505, 1956.

6. In een toekomstige pharmacopee kunnen als stamplanten van Valerianae Radix moeilijk „bepaalde cultigene klonen of gestabiliseerde cultivars" worden geeist zolang geen samengaan van „chemische of anatomische kenmerken van de ondergrondse delen met een bepaald morphologisch type" van de planten kan worden vastgesteld.

   Meyers, T., Ac. Proefschrift, Leiden 1957, blz. 98, 99.

7. Bij het invoeren van nieuwe geneesmiddelen, die in de vorm van zouten worden toegepast, verdient overwogen te worden de dosering uit te drukken in het therapeutisch werkzame gedeelte van het zout.

8. Het is tot op heden niet mogelijk om een verandering in het biologisch gedrag van eiwit, ontstaan tengevolge van het invoeren van jodium in het eiwitmolecule, anders dan langs biologische weg uit te sluiten.

Gordon, A.H., The Biochem.J. 66, 255, 1957.
Campbell, R.M., Cuthbertson, D.P., Matthews, C.M., McFarlane A.S., J.Applied Radiation and Isotopes, 1, 66, 1956.

9. Ureum kan door het dierlijk organisme worden gebruikt bij de synthese van eiwitten indien het als enige stikstofbron, naast minimale hoeveelheden essentiële aminozuren, wordt toegediend.

Rose, W.C., Dekker, E.E., J.Biol.Chem. 233, 107, 1956.

10. Bij het werken met radioactieve stoffen is het dragen van radiografische films over het algemeen niet voldoende voor een volledige controle op de ontvangen stralingsdoses.

Staatsblad 116 art. 30 1957.
Radiation Dosimetry, Ac.Press.Inc. 1956, New York, pag.482.